

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 5/00, 1/21, 1/19, 1/15, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02		A1	(11) 国際公開番号 WO00/14229 (43) 国際公開日 2000年3月16日(16.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04801 (22) 国際出願日 1999年9月3日(03.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/249752 1998年9月3日(03.09.98) JP 特願平11/70800 1999年3月16日(16.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒530-8205 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 高橋恒夫(TAKAHASHI, Tsuneo)[JP/JP] 〒108-0071 東京都港区白金台4-5-7-401 Tokyo, (JP) 大野満春(ONO, Mitsuharu)[JP/JP] 〒416-0933 静岡県富士市中丸703-21 Sizuoka, (JP) 石丸 弘(ISHIMARU, Hiroshi)[JP/JP] 〒222-0032 神奈川県横浜市港北区大豆戸町743 グリーンコーポ第6-309 Kanagawa, (JP) 菅野仁喜(KANNO, Kimiyoshi)[JP/JP] 〒416-0949 静岡県富士市森下64-11 Sizuoka, (JP)		高橋千晶(TAKAHASHI, Chiaki)[JP/JP] 〒416-0944 静岡県富士市横割5-4-1 旭化成あさぎり寮A402 Sizuoka, (JP) (74) 代理人 吉岡正志(YOSHIOKA, Masashi) 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目3番5号 赤坂アビタシオンビル3階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユー ラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: NOVEL RECEPTOR PROTEIN AND METHOD FOR DIAGNOSING INFLAMMATORY DISEASES BY USING THE SAME (54)発明の名称 新規な受容体蛋白質及びそれを用いた炎症性疾患の診断方法 (57) Abstract A novel seven-pass transmembrane receptor protein found out in immature dendritic cells; a DNA encoding this protein; a replicable recombinant DNA obtained by integrating the above DNA into a replicable expression vector; microbial or cultured cells transformed by the replicable recombinant DNA as described above; a seven-pass transmembrane receptor protein produced on the cell surface of the above transformant; a method for screening a ligand to the above seven-pass transmembrane receptor protein or a substance preventing the ligand from binding to the seven-pass transmembrane receptor protein; an antibody capable of binding to the seven-pass transmembrane receptor protein; and a method for diagnosing inflammatory diseases such as rheumatism which involves the step of measuring the expression dose of the seven-pass transmembrane receptor protein expressed in human leukocytes.			

(57)要約

本発明は、未成熟樹状細胞より見出された新規な7回膜貫通型受容体蛋白質及びそれをコードするDNAを開示する。更に、本発明は、上記のDNAを複製可能な発現ベクターに組込んでなる複製可能な組換え体DNA；上記の複製可能な組換え体DNAで形質転換された微生物又は培養細胞；上記の形質転換体の細胞表面に製造された7回膜貫通型受容体蛋白質；上記の7回膜貫通型受容体蛋白質に対するリガンドやそのリガンドと7回膜貫通型受容体蛋白質との結合を阻害する物質のスクリーニング方法；並びに上記7回膜貫通型受容体蛋白質と結合しうる抗体を開示する。更に、本発明は、ヒト白血球に発現されている7回膜貫通型受容体蛋白質の発現量を測定することを包含するリウマチ等の炎症性疾患の診断方法を開示する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GW	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MK	マケドニア	TR	トルコ
CA	カナダ	ID	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IN	インド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NL	オランダ	YC	ユーゴスラビア
CJ	キューバ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KP	北朝鮮	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KR	韓国	PL	ポーランド		
DE	ドイツ			PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明 細 書

新規な受容体蛋白質及びそれを用いた炎症性疾患の診断方法

技術分野

本発明は、未成熟樹状細胞より見出された新規な 7 回膜貫通型受容体蛋白質及びそれをコードする DNA に関する。更に詳細には、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるヒト由来の 7 回膜貫通型受容体蛋白質及びそれをコードする DNA に関する。本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質及びそれをコードする DNA を用いると、樹状細胞の機能が関与する疾患の治療又は予防に有用な物質のスクリーニングや、そのような疾患の診断方法や診断薬を作成することができる。又、本発明は上記の DNA を複製可能な発現ベクターに組込んでなる複製可能な組換え体 DNA；上記の複製可能な組換えベクターで形質転換された微生物又は培養細胞；上記の形質転換体の細胞表面に製造された 7 回膜貫通型受容体蛋白質；上記の 7 回膜貫通型受容体蛋白質に対するリガンドやそのリガンドと 7 回膜貫通型受容体蛋白質との結合を阻害する物質のスクリーニング方法；並びに上記 7 回膜貫通型受容体蛋白質と結合しうる抗体に関する。更に、本発明は、ヒト白血球に発現されている 7 回膜貫通型受容体蛋白質の発現量を測定することを包含する炎症性疾患の診断方法に関する。

従来技術

生体内で感染や炎症などの異常が発生すると、その異常は作用部位の細胞から放出される各種蛋白質因子により生体の防御にかかわる細胞に伝えられる。感染においては、白血球、特に好中球に代表される顆粒球やマクロファージなどの働きが生体防御反応の引き金となっている。また、顆粒球と同様に骨髓の造血幹細胞から派生している樹状細胞（リンパ節や胚中心に見られる胞体突起を延ばした星状の細胞）も免疫および炎症に関わる機能、特に抗原提示に大きな役割を果たしている。

抗原提示細胞の1つであるマクロファージは、活性化されたT細胞及びB細胞に対して抗原提示を行う（Sornasse et al., J. Exp. Med., 175, 15-21, 1992）が、ヘルパーT細胞の活性化は樹状細胞による抗原提示に依存する。樹状細胞は末梢血中の抗原をとらえ、リンパ液に移動して最終的にリンパ節で成熟すると考えられている。マクロファージと樹状細胞は共に全ての成熟段階において、既に活性化されているT細胞に抗原を提示することができるが、成熟樹状細胞のみがナイーブT細胞に感作することが報告されている（Mehta-Damani et al., J. Immunology, 153, 996-1003, 1994）。樹状細胞は造血幹細胞から誘導されるが、樹状細胞の前駆体及び未成熟の樹状細胞は血液やリンパ液中に存在し、完全に成

熟した樹状細胞は脾臓及びリンパ節に存在する。一般的に未成熟樹状細胞は抗原の取り込み能が高く、成熟するに従って抗原提示能が上昇する。そして、抗原提示を行っている樹状細胞はMHC (Major Histocompatibility Complex) クラスⅠタンパク質及びクラスⅡタンパク質を多量に発現している。

上記したように、樹状細胞は生体内の免疫および炎症に関わっており、有益な免疫応答によって生体を防御する。しかし、自己免疫などの望ましくない免疫作用および炎症作用を引き起こすこともある。従って、樹状細胞の機能を制御する方法を見出すことにより、有益な免疫応答による感染や腫瘍の治癒、あるいは有害な免疫応答の減退による自己免疫性疾患などの治療が可能になると考えられている。

樹状細胞の機能、即ち、その増殖、分化、活性化、化学遊走等は樹状細胞に発現している様々な受容体蛋白質によって制御されている。受容体とは、細胞表面に存在し、他の細胞の表面や体液中に存在する特定の物質（シグナル分子）と高い親和性で結合し、シグナル分子との結合という細胞外の出来事を細胞内シグナルに変換して細胞の応答を引き起こす蛋白質である(Alberts, Bruce et al. eds., "Molecular Biology of the Cell", 2nd ed., Garland Publishing, Inc., pp. 681-726, 1989)。受容体と結合する物質を一般的にリガンドという。樹状細胞で発現している受容体の機能を変化させる物質、即ち受容体と結合して細胞を刺激するものや、受容体

と結合して他のリガンドによる刺激を遮るもの、他のリガンドによる刺激が細胞内に伝達されることを阻害する物質を得ることができれば、得られた物質は樹状細胞の機能を正や負に制御し、樹状細胞の機能の不足や過剰に起因する疾患の治療に役立つと考えられる。

受容体としては、サイトカイン受容体群、EGF (Epidermal Growth Factor) 受容体群、7回膜貫通型受容体群など種々の受容体蛋白質が知られており ("The Leukocyte Antigen Facts Book", Academic Press Inc., 38-49, 1993)、その機能は多岐にわたっている。このような受容体群の一つである7回膜貫通型受容体蛋白質群は、G蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR)、ロドプシン型受容体などとも呼ばれている。7回膜貫通型受容体蛋白質の研究は比較的最近開始されたばかりであり、いまだ数多くの未知の7回膜貫通型受容体蛋白質が存在すると考えられている。

白血球を例にとって説明すると、現在までに白血球に存在する7回膜貫通型受容体として同定された受容体には、アナフィラトキシンと結合する受容体群、ケモカインと結合する受容体群、PAF (血小板活性化因子) と結合する受容体などが挙げられる。アナフィラトキシンの受容体は、好中球やマクロファージの機能、例えば、活性酸素の産生、化学遊走、細胞接着の活性化に関与している (Bouley, F. et al,

Biochemistry, 30, 2993-2999, 1991)。又、ケモカインと結合する受容体群の一つである I L - 8 (インターロイキン 8) 受容体のホモログの欠損したマウスに炎症誘導物質を腹腔内投与すると、好中球浸潤の減少、好中球増加症 (好中球は活性化され増殖するが浸潤しない)、骨髓やリンパ節での顆粒球や形質細胞の増加等が観察される (飯笹久と松島綱治著、臨床免疫 28、731~737、1996)。このような受容体に作用する物質のうち、疾患の治療剤としての可能性が考えられるものの中には、I L - 8 や M C P - 1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) のように受容体に結合して細胞を刺激するものや、I L - 8 変異体のように受容体と結合してリガンドによる刺激を遮るものがある (Howard, O.M.Z. et al. TIBTECH, 14, 46-51, 1996)。しかし、多くの場合、受容体は複数のシグナル分子と結合し、又、シグナル分子も複数の受容体と結合する。従って、疾患の治療を考えた場合には、シグナル分子を知ることだけでは不十分である。例えば、セロトニンの場合には、セロトニンという単一のシグナル分子に対し、7 回膜貫通型受容体の他にイオンチャンネル型受容体という全く異なるシグナル伝達経路の受容体を含む計 14 種の受容体と、更に、この 14 種類の受容体に特異的に結合する化合物が知られており (1996 Receptor & Ion Channel Nomenclature, Supplement 1-81 Trends Pharmacol.Sci., 1996)、各受容体の異なる疾患の治療への応用も考えられてい

る。また、ケモカイン群の場合には、単一のシグナル分子（一種のケモカイン）が多数の受容体と反応すると同時に、単一の受容体が多数のシグナル分子（多種のケモカイン）と反応する例も多く知られている（Power, C.A. et al., Trends Pharmacol. Sci., 17, 209-213, 1996）。

上記から明らかなように、仮に単一のシグナル分子が疾患の原因であるとしても、細胞の種類によって異なる受容体が複数存在する。そして疾患の原因である特定の細胞群の機能を持異的に制御するためには、その細胞に作用するシグナル分子の特定よりも、その細胞に発現している受容体を特定することが重要となる。例えば、シグナル分子群の一つであるケモカイン群を例にとると、白血球に作用するシグナル分子 R A N T E S（Regulated on Activation, Normal T cell expressed and secreted）に反応する白血球は種々存在するため、R A N T E S との反応性を示す白血球を特定することはできない。しかし、白血球の一種である好酸球はケモカイン受容体の一つである C C R 3（C-C Chemokine Receptor 3）を持異的に発現していることから、受容体 C C R 3 を用いれば、好酸球を持異的に制御する方法の検索が可能となる（Howard, O.M.Z. et al., TIBTECH, 14, 46-51, 1996）。

また、ヒトとその他の種の生物の受容体では、同一の化合物に対する反応が異なることも知られている（例えば、Marleau, S. et al., J. Immunol. 157, 4141-4146, 1996）。

ヒトの受容体に対して活性化の作用を示す物質が、他の種の受容体に対しては活性化を阻害する物質として働く例も知られている。更に、受容体の中にはウィルスの感染の際の受容体として働くものも知られており（例えば、Choe, H. et al., Cell 85, 1135-1148, 1996）、このような受容体に結合する分子がウィルスの感染を防ぐことも知られている（例えば、Bleul, C.C. et al., Nature, 382, 829-833, 1996）。こういった場合にも、ウィルスの感染する細胞に発現する受容体を知ることが肝要となる。また、特定のウィルスは、特定の生物種（species）の受容体と結合することによって感染が成立することも知られている。

シグナル分子の中には（例えば、ケモカインである P F 4 や H C C 1 などは）、その受容体が 7 回膜貫通型受容体であると推定されているが、受容体蛋白質は同定されていないものもある（Premack, B.A. et al., Nature Medicine, 2, 1174-1178, 1996；及び Loetscher, M. et al., J. Exp. Med., 84, 963-969, 1996）。特にケモカイン群については、更に多くの未知のケモカインが存在すると推定されており（Howard, O.M.Z. et al., TIBTECH, 14, 46-51, 1996）、未知のケモカインに対する多くの受容体が存在すると期待されている。

上記した白血球の場合と同様に、樹状細胞に作用する分子の受容体はすべて理解されたわけではなく、樹状細胞にも多くの 7 回膜貫通型受容体が存在すると考えられている。成熟

した樹状細胞に存在する 7 回膜貫通型受容体としては、ChemR23 が報告されている (Samson, M. et al., Eur. J. Immunol., 28, 1689-100, 1998)。樹状細胞の異なる分化段階において発現する受容体を取得し、更にそれらの受容体の作用を変化させる物質を得ることができれば、樹状細胞の機能を制御し、ひいては、疾患を制御する方法の確立が期待される。

7 回膜貫通型受容体に作用する内因性の物質としては、様々な受容体に対し様々な物質が知られている。例えば、生理アミンであるグルタミン酸やドーパミンは、それぞれグルタミン酸受容体群、ドーパミン受容体群に結合する。また、ペプチドである神経ペプチド Y やエンドセリンはそれぞれ神経ペプチド Y 受容体群、エンドセリン受容体群に結合する (Watson, S. and Arkininstall, S., "The G-protein linked receptor Facts Book", Academic Press Inc., 1994)。これらの中には、ケモカイン群や PAF のように白血球に作用することが知られている物質と、白血球には作用しない物質が含まれている。

上記のような 7 回膜貫通型受容体を活性化する物質は、天然・非天然を問わず、その物質と、7 回膜貫通型受容体そのものと、受容体を発現している細胞との 3 者それぞれの状態に依存して様々な細胞内シグナルの変動を引き起こす。そのシグナルの変動は、例えば、細胞内 cAMP 濃度の上昇や下

降、イノシトールリン酸濃度の上昇、細胞内カルシウム濃度の上昇といった反応であり (Watson, S. and Arkininstall, S., "The G-protein linked receptor Facts Book", Academic Press Inc., 1994)、それぞれを測定する方法も開発されている。従って、上記の様な反応を測定することにより、特定の物質が特定の 7 回膜貫通型受容体を活性化するかどうか、あるいはその活性化を妨げるかどうかを判断することができる。又、このような物質が 7 回膜貫通型受容体と結合して生じる細胞増殖、遺伝子発現の変動や化学遊走などの生理学的な現象を観察する方法も知られており、これらの現象をある物質が特定の 7 回膜貫通型受容体を活性化するかどうか、あるいはその活性化を妨げるかどうかを判断するための指標として用いることができる。このように 7 回膜貫通型受容体に作用する物質の同定方法には色々あるが、これらの方法を利用してヒトの医薬品として有用な物質を得るためには、初めにヒト由来の 7 回膜貫通型受容体蛋白質を取得するが肝要である。

同様に各種 7 回膜貫通型受容体 (例えばケモカイン受容体群) に特異的に作用する物質が得られれば、特定の炎症反応等を選択的に抑制する新しい医薬品の開発に繋がる可能性がある。

ケモカインを例に挙げると、一群のケモカイン及びケモカイン受容体は各種白血球の遊走を制御している。従って、特

定の白血球には特異的なケモカイン受容体の発現があると考えられる。実際、CCR5はTh1細胞、CCR4はTh2細胞に発現しているとの報告があり (Loetscher, P. et al., NATURE, 391, 344-345, 1998; 及び Bonecchi, R. et al., J. Exp. Med., 187, 129-134, 1998)、抗原非特異的な炎症に続く、特異的な細胞性免疫や液性免疫反応の選択にケモカイン受容体の関与が示唆されている。また、CXC及びCCケモカイン等の主に好中球や単球に作用するケモカインは急性あるいは慢性の炎症反応においては重要な役割を果たすところから、炎症性ケモカインと呼ばれている。このような炎症性ケモカインの受容体について、例えば、末梢血中のケモカイン受容体の発現を解析することで、炎症性疾患の検出やその疾患の重症度、治療経過などの診断が可能になる。

上記のような受容体の解析によって、未だ病因の解明されていない炎症性疾患などの新たな診断方法や治療方法の開発も可能になると考えられる。例えば、リウマチは多発するびらん性関節炎を主徴とし、同時に多臓器を傷害する原因不明の全身性炎症疾患である。寛解と増悪を繰り返しながら慢性に進行して関節の破壊と変形を来し、終局的には運動器の機能障害を呈してくる。現時点では、出来得る限り早期にリウマチを診断して、リウマチ炎症を可及的速やかにかつ最大限に抑制して、関節破壊のようなもとに戻すことが不可能な症状の出現を防止することが治療の目標である。

上記から明らかなように、リウマチの治療は早期に開始することが非常に重要である。従来のピラミッド方式 (Smyth, C.J., Postgrad. Med., 51, No. 6, 31-39, 1972) の慢性関節リウマチ (RA) の治療では、非ステロイド性抗炎症剤 (NSAID) のみで3~6ヶ月間治療を行い、RAであることを見極めた後に疾患修飾性抗リウマチ剤 (DMARD) を投与していた。NSAIDによる治療の最中にRAが進行して罹患関節数が増加してしまうと、DMARDの効果は著しく減弱し、もはや骨破壊を止めることは困難となる。従って、骨破壊の起こる前の初期段階からDMARDを投与するには、RAの早期診断が必要である。現在用いられているRAの診断基準 (Arnett, F.C. et al., The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum, 31, 315-324, 1988) では、早期のRA診断は難しく、診断までに少なくとも6週間が必要である。また、臨床検査所見では、赤血球の沈降速度 (赤沈; 組織の破壊や炎症により亢進する非特異的反応) や組織の破壊や炎症に際して急速に増量する急性反応物質であるCRP (C反応性蛋白質) の量は、早期RA患者群に有意に認められるが、いずれもRA特異的ではないため、RAと他の膠原病などとの鑑別に用いることはできない。また、早期RAの赤沈が正常でも、X線で見ると骨破壊の進行が認められる例がある。更にリウマトイド因子は、発症1年

以内の早期 R A では 71 % が陽性であるが、発症 6 週以内では 59 % と陽性率は低い。白血球数、赤血球数、血色素においては、早期 R A (1 年以内) と早期非 R A 関節疾患群の間で有意差は認められない (山前邦臣著、医学のあゆみ、182、No.9、605-610、1997)。

従って、リウマチの治療には早期診断が必要であるにもかかわらず、リウマチの診断に有用な診断マーカーは確立されておらず、早期リウマチの診断は困難である。

発明の概要

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、未成熟樹状細胞に新規な 7 回膜貫通型受容体が存在すると考え、これが樹状細胞の機能を制御する医薬品の探索に役立つと考えた。初めに、Differential Display 法 (例えば、Liang, P. et al., Curr. Biol., 7, 274-280, 1995)、RDA 法 (Lisitsyn, N. et al., Science, 259, 946-951, 1993)、Degenerative PCR 法 (Innis, M.A. et al., PCR Protocols, 39-53, 1990) などの種々の方法を用いて、未成熟樹状細胞に発現している新規な 7 回膜貫通型受容体蛋白質 cDNA の取得を試みた。特に degenerative PCR 法については、実施例 1 に示すプライマーを一例とする 20 種以上のプライマーを試験した。このような鋭意研究の結果、樹状細胞から新規な 7 回膜貫通型受容体の cDNA 断片を取得し、更に得られた cDNA 断片の全長

コード領域の取得に成功した。本発明者らはこの新規な7回膜貫通型受容体をC5L2と命名した。更に、この新規なDNAがコードする受容体蛋白質の発現系を作成した。また、ヒト組織、白血球、白血病細胞株などにおけるC5L2の発現をノーザンブロッティングを用いて検討し、白血球、特に顆粒球にC5L2の強い発現があることを見出した。

本発明の新規な7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質はケモカイン、FMLP、C5aなどの走化性因子に対する受容体と同様の構造を有することから、さまざまな炎症性疾患の医薬、診断、医療の分野での利用が考えられた。更に本発明者らは、本発明の受容体が炎症性疾患の診断に役立つと考え、リウマチとC5L2との関連について検討した。その結果、炎症性疾患の診断に7回膜貫通型受容体C5L2が有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

従って、本発明の主たる1つの目的は、樹状細胞の機能を制御する医薬品の探索に有用なヒト由来の7回膜貫通型受容体蛋白質を提供することにある。

本発明の他の1つの目的は、上記7回膜貫通型受容体蛋白質をコードするDNA、このDNAを発現ベクターに組込んでなる組換え体DNA、及びこの組換え体DNAで形質転換された微生物又は培養細胞を提供することにある。

本発明の更に他の1つの目的は、7回膜貫通型受容体蛋白質と結合しうるリガンドをスクリーニングする方法、及び7

回膜貫通型受容体蛋白質と該蛋白質に対するリガンドとの結合を阻害する物質をスクリーニングする方法を提供することにある。

本発明の更に他の1つの目的は、7回膜貫通型受容体蛋白質と結合する抗体を提供することにある。

本発明の更に他の1つの目的は、ヒト白血球に発現されている7回膜貫通型受容体蛋白質の発現量を測定することを包含する炎症性疾患の診断方法を提供することにある。

本発明の上記及び他の諸目的、諸特徴並びに諸利益は、添付の図面及び配列表を参照しながら述べる次の詳細な説明及び請求の範囲の記載から明らかになる。

配列表のフリーテキスト

配列番号5においては、18、22と24残基めのnはイノシン/iを示す。この配列はメラノーマの増殖に関与していると考えられる公知の7回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインしたdegenerative PCR法のためのプライマーである。

配列番号6においては、22と28残基めのnはイノシン/iを示し、21残基めのnはaまたはgまたはcまたはtを示す。この配列はメラノーマの増殖に関与していると考えられる公知の7回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザイ

ンした degenerative PCR 法のためのプライマーである。

配列番号 7 の配列は、配列番号 1 の塩基配列の 1 番目の a から 22 番目の t に相当する 22 塩基の配列の 5' 末端にスパーサー配列 g g g g および制限酵素 *Hind* III の認識配列 a a g c t t を加えた配列であり、C5L2 の発現ベクターの構築に用いた化学合成プライマーである。

配列番号 8 の配列は、配列番号 4 の塩基配列の 206 番目の c から 225 番目の a に相当する 20 塩基の配列の 5' 末端にスパーサー配列 g g g a と制限酵素 *Sac* II の認識配列 c c g c g g を加えた配列であり、C5L2 の発現ベクターの構築に用いた化学合成プライマーである。

配列番号 9 の配列は、C5L2 の RT-PCR で用いられた化学合成プライマーである。

配列番号 10 の配列は、C5L2 の RT-PCR で用いられた化学合成プライマーである。

配列番号 11 の配列は、G3PDH (グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素) の RT-PCR で用いられた化学合成プライマーである。

配列番号 12 の配列は、G3PDH の RT-PCR で用いられた化学合成プライマーである。

図面の簡単な説明

図面において、

図1(a)及び(b)はそれぞれフローサイトメーターを用いて得られた未成熟樹状細胞と成熟樹状細胞の細胞表面のC5L2の発現を示すヒストグラムであり、縦軸には細胞の量を示し、横軸には細胞表面に存在する抗原の量を、抗原に結合するFITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗体の蛍光強度で示す。太い線はビオチン化標識した抗C5L2抗血清を一次標識として用いた結果であり、細い線はビオチン化標識したウサギIgG抗体を一次標識として用いたネガティブコントロールの結果である。

図2は、健康人ボランティア末梢血から調製した顆粒球を室温で保存したときのC5L2発現率の経時変化を表すグラフであり、縦軸にはC5L2発現率を示し、横軸には採血後の経過時間を示す。グラフ中、黒点は個々の値を示し、直線はその平均値をむすんだものである。

図3は、RA患者新鮮血から調製した顆粒球中のC5L2発現率とリウマトイド因子との相関を示すグラフ（散布図）であり、縦軸はリウマトイド因子の値を示し、横軸はC5L2の発現率を示す。

発明の詳細な説明

本発明の1つの態様によれば、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする実質的に純粋なヒト由来の7回膜貫通型受容体蛋白質が提供される。

次に、本発明の理解を容易にするために、まず本発明の基本的特徴及び好ましい態様を列挙する。

1. 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする実質的に純粋なヒト由来の7回膜貫通型受容体蛋白質。

2. 配列番号2に記載のアミノ酸配列の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる部分配列であることを特徴とする実質的に純粋なペプチド。

3. 前項1に記載の7回膜貫通型受容体蛋白質をコードする単離されたDNA。

4. 配列番号1に記載の塩基配列を有することを特徴とする前項3に記載の単離されたDNA。

5. 配列番号3に記載のDNAの中の連続した少なくとも12個の塩基からなるDNA断片あるいはその誘導体。

6. 配列番号4に記載のDNAの中の連続した少なくとも12個の塩基からなるDNA断片あるいはその誘導体。

7. 配列番号3に記載のDNAに相補的なRNAの中の連続した少なくとも12個の塩基からなるRNA断片あるいはその誘導体。

8. 前項3～6のいずれかに記載のDNAを複製可能な発現ベクターに組込んでなる複製可能な組換え体DNA。

9. 前項8に記載の複製可能な組換え体DNAで形質転換された微生物又は培養細胞。

10. (a)前項3または4に記載のDNAを複製可能な発現ベクターに結合して、該DNAと複製可能な発現ベクターとを組込んでなる複製可能な組換え体DNAを得、

(b) 該複製可能な組換え体DNAで微生物又は培養細胞を形質転換させて形質転換体を形成せしめ、

(c) 該形質転換体を該微生物又は培養細胞の親細胞から選別し、

(d) 該形質転換体を培養して、該形質転換体に該DNAを発現させる、

ことを包含する方法によって該形質転換体の細胞表面に製造された7回膜貫通型受容体蛋白質。

11. 7回膜貫通型受容体蛋白質と結合しうるリガンドをス

クリーニングする方法にして、前項 1 又は 10 に記載の蛋白質、あるいは前項 2 に記載のペプチドを、サンプル材料と接触せしめ、該蛋白質又は該ペプチドとリガンドとの結合に対応して起きる変化を指標として、7 回膜貫通型受容体蛋白質と結合しうるリガンドを検出することを包含する方法。

12. 7 回膜貫通型受容体蛋白質と該蛋白質に対するリガンドとの結合を阻害する物質をスクリーニングする方法にして、前項 1 又は 10 に記載の蛋白質、あるいは前項 2 に記載のペプチドと該リガンドをサンプル材料と接触せしめ、そして該蛋白質又は該ペプチドと該リガンドとの結合に対応して起きる変化を指標として、7 回膜貫通型受容体蛋白質とリガンドとの結合を阻害しうる物質を検出することを包含する方法。

13. 前項 1 に記載の 7 回膜貫通型受容体蛋白質と特異的に結合しうる抗体。

14. 炎症性疾患の診断方法にして、ヒト白血球に発現されている 7 回膜貫通型受容体蛋白質の発現量を測定することを包含し、該 7 回膜貫通型受容体蛋白質が配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質であることを特徴とする炎症性疾患の診断方法。

15. 該炎症性疾患が慢性関節リウマチであることを特徴とする前項14に記載の診断方法。
16. 該ヒト白血球がヒト顆粒球であることを特徴とする前項14又は15に記載の診断方法。
17. 該ヒト顆粒球がヒト組織から採取した顆粒球であることを特徴とする前項16に記載の診断方法。
18. 該ヒト顆粒球が診断を行う少なくとも6時間前に採取した顆粒球であることを特徴とする前項17に記載の診断方法。
19. 該発現量の測定を、該蛋白質をコードするmRNAの定量により行うことを特徴とする前項14に記載の診断方法。
20. 該mRNAの定量を、RT-PCR法で行うことを特徴とする前項19に記載の診断方法。
21. 該発現量の測定を、該白血球の細胞表面に存在する該蛋白質の定量により行うことを特徴とする前項14に記載の診断方法。

22. 該蛋白質の定量を、該蛋白質と特異的に反応する抗体を用いて行うことを特徴とする、前項21に記載の診断方法。

以下、本発明について詳細に説明する。

配列表に記載されたアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれアミノ基末端（以下、N末という）及びカルボキシル基末端（以下、C末という）であり、また塩基配列の左端及び右端はそれぞれ5'末端及び3'末端である。

尚、本発明において、DNA塩基配列中のaはアデニン、cはシトシン、gはグアニン、tはチミンを示す。

また、本発明においては、3文字表示で、アミノ酸配列中のA l aはアラニン、A r gはアルギニン、A s nはアスパラギン、A s pはアスパラギン酸、C y sはシステイン、G l nはグルタミン、G l uはグルタミン酸、G l yはグリシン、H i sはヒスチジン、I l eはイソロイシン、L e uはロイシン、L y sはリジン、M e tはメチオニン、P h eはフェニルアラニン、P r oはプロリン、S e rはセリン、T h rはスレオニン、T r pはトリプトファン、T y rはチロシン、V a lはバリンである。

本発明でいう「樹状細胞」とは、リンパ節や胚中心に見られる胞体突起を延ばした星状の細胞であり、血液幹細胞由来の抗原提示細胞の一つである。近年、樹状細胞のインビトロ

での大量調製も可能となった (Romani et al., J. Exp. Med., 180, 83-93, 1994)。骨髓由来もしくは臍帯血由来の未分化な CD 3 4 陽性細胞又は末梢血単球から分化誘導することが可能であり、具体的には、GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) と IL-4

(Interleukin 4) の2種で刺激すると未成熟樹状細胞を、IL-4、GM-CSF と TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) の3種で刺激すると成熟樹状細胞を誘導することができる (Talmor M et al., Eur. J. Immunol., 28, 811-817, 1998; 及び Morse MA et al., Ann Surg., 226, 6-16, 1997)。

本発明でいう「白血球」とは、単核球 (リンパ球・単球) および顆粒球 (好中球・好酸球・好塩基球) の総称である。顆粒球は白血球の中でも核が棒状あるいはそれにくびれができて分葉した細胞であり、上記のように、好中球、好酸球、好塩基球から構成される。

本発明でいう「ヒト組織」には、血液、滑液、リンパ液などの体液、及びリンパ節、脾臓、骨髓、腸管、滑膜等の組織や臓器が含まれる。また、「組織の採取」とは、組織を体外に取り出すことであり、血液であれば採血を意味する。

本発明でいう「炎症」とは、非特異的又は特異的な防御系の反応を含む生体の反応である。非特異的防御系反応とは、一般的に免疫学的記憶が不可能であると考えられる白血球 (マクロファージ、好酸球および好中球を包含する) によっ

て仲介される炎症応答を意味する。非特異的反応の例として、蜂の刺創直後の腫脹、バクテリアの感染部位における白血球の集まり（例えば、細菌性肺炎における肺の浸潤および膿瘍における膿の形成）などが挙げられる。特異的防御系反応とは、抗原に対する特異的免疫系の反応を意味する。特異的防御系反応の例としては、抗原（例えばウィルス）に対しての抗体の応答や遅延型過敏症などが挙げられる。本発明でいう「炎症性疾患」とは、上記の非特異的防御系機能および特異的防御系機能の両方の低下または亢進により、人体に障害を生じる疾患である。従って、炎症性疾患には感染症や自己免疫疾患が含まれる。本来、感染症とは、免疫系（ウィルス、細菌、寄生虫、カビなどの外部からの感染に対して、宿主である自己を防衛するシステム）に異常をきたし、排除すべき外部からの感染を排除できずに引き起こされる疾患であり、一方、自己免疫疾患とは、本来排除してはならない自己を排除する方向に免疫系がはたらく疾患である。自己免疫疾患には、臓器や器官に特異的な疾患と、非特異的な全身性の疾患が知られている。免疫調節異常には全身性紅斑性狼瘡、慢性リウマチ様関節炎、Ⅰ型糖尿病、炎症性腸疾患、胆汁性肝硬変、葡萄膜炎、多発性硬化症や、クローン病、潰瘍性大腸炎、水泡性天疱瘡、サルコイドーシス乾癬、魚鱗癬及びグレーブス眼病などの疾病も含まれており、その範囲は広範囲にわたる。

本発明でいう「7回膜貫通型受容体蛋白質」とは、白血球受容体群の一つであり、G蛋白質共役型受容体(GPCR)、ロドプシン型受容体等とも呼ばれるものである。

又、本発明で述べられる遺伝子操作に必要なcDNAの作製、ノーザンブロッティングによる発現の検討、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング、組換えDNAの作製、DNAの塩基配列の決定、cDNAライブラリーの作製等の一連の分子生物学的な手法は、実験書に記載されている通常の方法に従って行うことができる。具体的には、“Molecular Cloning, A laboratory manual”, Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989等を参照することができる。

次に、本発明の基本的特徴を更に明らかにする為に、本発明の完成に至る経緯を追いながら、本発明に包含される技術的特徴について説明する。

下記に示すように、本発明の7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質のcDNA断片は未成熟樹状細胞より見出されたものであり、また、その全長cDNAは胎盤由来のcDNAライブラリーから取得された。更に、C5L2のmRNAは正常末梢血白血球中にも検出された。本発明者らが見出した7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質をコードする全長cDNAを、本明細書の配列表の配列番号1に示した。配列番号1の塩基

配列について、公知の遺伝子の cDNA 配列とのホモロジーを比較した。具体的には、GENETYX-Mac/DB Ver. 39.1 (Software Development Co., Ltd.) を用いてデータベース GenBank (リリース 106.0, April, 1998) で配列番号 1 に示した塩基配列とのホモロジーを検索した。その結果、次の上位 10 種の配列が検出された (以下、大括弧内はエントリー名、数値はホモロジーである) :

P. pygmaeus DNA for C5a receptor [PPC5AR] 56.3%;

G. gorilla DNA for C5a receptor [GGC5AR] 56.7%;

H. sapiens C5aR rRNA for C5 anaphylatoxin receptor [HSC5AR] 56.8%;

Human C5a anaphylatoxin receptor mRNA [HUMC5AAR] 56.8%;

H. sapiens RNA for receptor for C5a anaphylatoxin [HSC5ANAPL] 56.8%;

M. mullata DNA for C5a receptor fragment [MMC5AR] 56.2%;

P. troglodytes DNA for C5a receptor [PTC5AR] 56.6%;

C. familiaris mRNA for complement C5a receptor [CFCOMC5AM] 59.1%;

Rattus norvegicus mRNA for C5a receptor [AB003042] 57.2%;

及び

R. norvegicus mRNA for C5a receptor [RNC5AREC] 57.2%。

上記から明らかなように、本発明の 7 回膜貫通型受容体 C5L2 蛋白質をコードする cDNA は、ヒトを含めた各種生

物のアナフィラトキシン受容体 C5a-R (Kroll, B. et al., FEBS Lett., 291, 208-210, 1991) とのホモロジーを示しながらも、そのホモロジーはわずか 56 ~ 59 % 程度だった。

更に、本発明者らは、上記した本発明の塩基配列から得られた推定アミノ酸配列を配列表の配列番号 2 に記載した。このアミノ酸配列について、公知の遺伝子がコードするアミノ酸配列とのホモロジーを比較した。具体的には、GENETYX-Mac/DB Ver. 39.1 (Software Development Co., Ltd.) を用いて Swiss - Prot (リリース 35.0, November, 1997) でホモロジーを検索した。その結果、次の上位 10 種の配列が検出された (以下、大括弧内はエントリー名、数値はホモロジーである) :

C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR (C5A-R) (CD88)
[C5AR-HUMAN] 38.2%;

C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR (C5A-R) [C5AR-CANFA] 39.6%;

C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR (C5A-R) [C5AR-MOUSE] 38.1%;

FMLP-RELATED RECEPTOR II (FMLP-R-II) (RFP) (HM63) [FML2-HUMAN] 29.9%;

FMET-LEU-PHE RECEPTOR (FMLP RECEPTOR) (N-FORMYL PEPTIDE RECEPTOR) [FMLR-HUMAN] 28.8%;

PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR1 [GPR1-RAT] 28.1%;
FMET-LEU-PHE RECEPTOR (FMLP RECEPTOR) (N-FORMYL PEPTIDE
RECEPTOR) [FMLR-RABIT] 29.8%;
FMET-LEU-PHE RECEPTOR (FMLP RECEPTOR) (N-FORMYL PEPTIDE
RECEPTOR) [FMLR-MOUSE] 28.5%;
PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR1 [GPR1-HUMAN]
28.1%; 及び

FMLP-RELATED RECEPTOR I (FMLP-R-I) [FML1-HUMAN] 26.3%.

上記から明らかなように、本発明の7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質のアミノ酸配列は、公知のヒトおよびその他のほ乳類の7回膜貫通型受容体蛋白質とのホモロジーを示しながらも、そのホモロジーはわずか30～40%程度だった。

上記のホモロジー検索の結果から、本発明者らが見出したC5L2は、公知のヒトおよびその他のほ乳類の7回膜貫通型受容体蛋白質とcDNA配列で60%未満、アミノ酸配列で40%未満のホモロジーしか示さない新規な配列であることが判明した。

更に本発明者らは、Kyte-Doolittleの方法(J., Mol. Biol., 157, 105-132, 1982)に従って、配列番号2のアミノ酸配列の疎水性部分と親水性部分を解析した。その結果から、C5L2は細胞膜通過部分を7つ有する細胞膜蛋白質として、細胞表面に発現していることが示唆された。又、上記のホモロジー検索において、C5L2との相同性が認められた配列

はいずれも7回膜貫通型受容体蛋白質であることから、本発明の蛋白質は新規な7回膜貫通型受容体蛋白質であると結論付けられた。

公知の受容体蛋白質においては、種間のホモロジーが非常に高いことが知られており、例えば、アンジオテンシン受容体Iaの場合、ヒト(Swiss-Prot Entry: AG2R-Human)とラット(Swiss-Prot Entry: AC22-Rat)とのホモロジーは90%を越える。しかし、本発明の7回膜貫通型受容体C5L2と高いホモロジーを示す配列はデータベース上に発見されていない。従って、C5L2は他の生物種で知られている受容体のヒトにおける対応物ではなく、新規な受容体であると考えられる。

本発明のC5L2はアナフィラトキシン受容体C5a-Rと僅かながらもホモロジーを有することから、ヒトアナフィラトキシン受容体と同じサブファミリーに属すると考えられる。最近の報告によると、ヒトアナフィラトキシン受容体C5a-R (Kroll, B. et al., FEBS Lett., 291, 208-210, 1991)、ヒトアナフィラトキシン受容体C3a-R (Crass, T. et al., Eur. J. Immunol., 26, 1944-1950, 1996)、菌由来ペプチドFMLP受容体 (Boulay, F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 168, 1103-1109, 1990)、ChemR23 (Samson, M. et al., Eur. J. Immunol., 28, 1689-1700, 1998)等は、ホモロジーからみてGPCRファミリー

の中でサブファミリーを形成している (Samson, M. et al., Eur. J. Immunol., 28, 1689-100, 1998)。このサブファミリーに属する受容体はいずれも免疫調節に深く関与している (例えば、アナフィラトキシン受容体 C3a-R や C5a-R は生体のアレルギーや炎症作用、FMLP-R 群は感染防御、ChemR23 は抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージを介した免疫誘導に関わっている) ことが知られている。このサブファミリーに属する本発明の C5L2 もまた、炎症や感染による免疫調節に深く関与していると考え、本発明者らは、C5L2 と炎症性疾患との関係について検討した。その結果、末梢血白血球が C5L2 の発現を強く示すこと、その中でも顆粒球が特に強い発現を示すことがノーザンブロットイングによって判明した。また、本発明者らは、採取した体液または組織中で、C5L2 発現量が採取後変化する可能性に着目し、採血直後および一定時間経過後の末梢血に含まれる顆粒球を分画して、経時的な C5L2 発現量の変化を解析した。その結果、健常人末梢血由来の顆粒球においては、C5L2 の mRNA 量は採血から 6 時間の間に急激に減少し、その後 24 時間後まで緩やかに減少していくことが見出された。一方、RA 患者末梢血を同様にして解析したところ、RA 患者の末梢血由来顆粒球中の C5L2 の mRNA 量は採血後 24 時間経っても減少しないことが明らかとなった。この現象はケモカインレセプターである CCR4、CCR5 では

見られず、C5L2に特有の現象であることが本発明者等によって見出された。

以上のような鋭意研究の結果、本発明者らは、採血後のC5L2発現量の変化が炎症性疾患のマーカーとして有用であることを見出し、本発明を完成した。

本発明によれば、7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質の全長蛋白質及びその部分ペプチドが提供される。

本発明の7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質は、末梢白血球、特に顆粒球に強く発現している7回膜貫通型受容体であり、本発明者らによって初めて見出された蛋白質である。本発明の蛋白質は、受容体に対する特異的なリガンドとの結合活性、及びシグナル伝達経路において下流側に存在するシグナル伝達活性を有する蛋白質である。

このような蛋白質の1つが配列番号2のアミノ酸配列を有する蛋白質であるが、本発明の蛋白質は、配列番号2のアミノ酸配列に限定されるものではない。上記した受容体としての特性を有するポリペプチドであれば、自然界で生じることが知られている生物種内変異、アレル変異等の突然変異によって生じる改変体（即ち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列）も本発明の蛋白質に含まれる。アミノ酸の改変、置換に関しては例えば Bennett 等の特許出願（国際公開公報 WO 96 / 02645）などに

詳しく記載されており、これを参考にして作製することができる。また、本発明には上記のような蛋白質の塩も含まれる。

又、本発明の蛋白質は翻訳後修飾を受けていてもよい。配列番号2のアミノ酸配列には、糖鎖が付加されうる部分が存在する。例えば、配列番号2の3番目のAsnは、N-グリコシド結合の共通配列 Asn-X-Ser/Thr の Asn であると考えられ、N-グリコシド修飾を受ける可能性がある。又、N-アセチル-D-ガラクトサミンのO-グリコシド結合を推定する部分として、セリン又はスレオニン残基が頻出する部分が考えられる。これらの糖鎖が付加された蛋白質の方が糖鎖の付加されていない蛋白質そのものよりも一般に生体内での分解に対して安定であり、また強い生理活性を有していると考えられる。従って、本発明の蛋白質には、配列番号2のアミノ酸配列の中にN-アセチル-D-グルコサミンやN-アセチル-D-ガラクトサミンなどの、N-グリコシド又はO-グリコシド結合を有する糖鎖を包含する蛋白質も含まれる。

更に本発明の蛋白質は、抗原エピトープ等の公知のタグ配列を有してもよい。例えば、FLAG (MDYKDDDDK)、T7 (MASMTGGQQMG)、HSV (SQPELAPEDPED)、S (KETAAAKFERQHMDS)、Myc (EQKLISEEDL)、His (HHHHHHHH)、HA (YPYDVPDYA) 等のタグ配列（カッコ内の配列は全てアミノ酸の1文字表記である）を有していてもよい。タグ配列がC5L2蛋白質のC末端又はN末端に存在す

ることにより、本発明の蛋白質をフローサイトメトリーやウェスタンブロッティング（イムノブロッティング）等の手法を用いて容易に検出することができる。

C5L2蛋白質及びその断片は、診断を目的とした抗体の作成や、治療を目的とした医薬品の検索に有用である。

C5L2蛋白質の部分配列からなるペプチドは、本発明のC5L2全長蛋白質の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる部分配列であり、この部分ペプチドは、全長蛋白質と同様に、抗体の作製、リガンドのスクリーニング、及びC5L2に結合して樹状細胞の反応を制御したり疾患の治療を行う物質を検索する上で有用である。抗体の作成、即ち、抗原として用いるペプチドとしては、例えば、細胞外領域又は細胞内領域に相当する部位の5～8アミノ酸残基のペプチドが適当である。具体的には、実施例9で抗体の作成に用いた配列番号2のアミノ酸配列の中の6～32番目のアミノ酸からなる部分ペプチドや1～23番目のアミノ酸からなる部分ペプチドを抗原として用いることができる。リガンド等のスクリーニングに用いる部分ペプチドとしては、例えば、C5L2のリガンド結合部位と考えられるN末端細胞外領域（配列番号2の1～35番目のアミノ酸残基）や、第1細胞外ループ部（配列番号2の96～108番目のアミノ酸残基）、第2細胞外ループ部（配列番号2の172～198番目のアミノ酸残基）又は第3細胞外ループ部（配列番号2の681～72

6 番目のアミノ酸残基)を含むペプチドを用いることができる。

本発明の蛋白質及びその部分ペプチドを取得する方法は特に限定されないが、具体的には、アミノ酸配列の情報を基に合成ペプチドを調製する方法、又はペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞に導入してペプチドを合成する方法が挙げられる。ペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞に導入してペプチドを合成する方法としては、成書 (Kriegler, "Gene Transfer and Expression - A Laboratory Manual", Stockton Press, 1990; および横田ら、バイオマニュアルシリーズ 4、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社、1994) 等に記載されている多数の方法を参照することができる。

本発明によれば、上記した 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 をコードする DNA が提供される。

7 回膜貫通型受容体 C 5 L 2 蛋白質をコードする DNA の 1 例として、本発明のヒト由来の c DNA 配列を配列番号 1 にアミノ酸配列とともに記載した。更に、C 5 L 2 の mRNA の配列から得られた DNA の配列を配列番号 3 に、配列番号 3 の DNA 配列に相補的な DNA 配列を配列番号 4 に記載した。配列番号 3 の配列は、配列番号 1 の DNA 配列とその 5' 及び 3' 末端に存在する非翻訳領域 (それぞれ 1 ~ 71 番目の塩基配列及び 1086 ~ 1287 番目の塩基配列) からなる塩基配列である。自然界から分離した染色体 DNA

又はcDNAにおいて、遺伝コードの縮重によりそのDNAがコードするアミノ酸配列を変化させることなくDNAの塩基配列が変異した例は屢々認められる。このような変異や遺伝コードの縮重によって得られる塩基配列も、本発明のDNAに含まれる。又、5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域は蛋白質のアミノ酸配列の規定には関与しないので、非翻訳領域の塩基配列は変異しやすい。このような変異や遺伝コードの縮重によって得られる塩基配列も本発明のDNAに含まれる。

本発明者らが取得したC5L2の全長塩基配列を配列番号1に示したが、この配列とは異なる配列を有するクローンも確認された。配列番号1のDNA配列の724番～729番にはチミン(t)が6個連続して並んでいるが、さらにtが1個付加されて7個連続しているクローンも検出された。本発明のC5L2のこの部位を含む核酸プローブ、核酸プライマーを利用することで、tが6個連続している配列とtが7個連続している配列を区別して検出することができる。

本発明のC5L2をコードするDNAを取得するには、本明細書の配列番号1、3及び4に記載した塩基配列を基に合成すればよい。天然のDNAが必要な場合には、未成熟樹状細胞や正常末梢血由来白血球などのC5L2の発現が確認されている組織から抽出したり、本明細書の実施例2で行ったように胎盤由来cDNAライブラリーから取得することもできる。又、配列番号1に記載したC5L2をコードするDN

Aを取得するには、C5L2の全アミノ酸配列をコードするcDNAを含む組換え体DNAを導入した形質転換体（具体的には、本発明者らが寄託した*E. coli*: DH5 - pcDNA C5L2など）から単離することもできる。

更に本発明は、配列番号3又は4に記載のDNAの中の連続した少なくとも12個の塩基からなるDNA断片及びその誘導体、並びに配列番号3に記載のDNAに相補的なRNAの中の連続した少なくとも12個の塩基からなるRNA断片及びその誘導体を提供する。

上記したように、本発明の遺伝子は他の公知の遺伝子とのホモロジーが低い（60%未満である）ため、他の遺伝子をプローブとして用いたクロスハイブリダイゼーション法などでクローニングすることは困難である。クロスハイブリダイゼーションを用いたクローニングの例は多数存在するが（例えば、Murphy, P.M. et al., *Science*, 253, 1280-1283, 1991; Combadiere, C. et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 16491-16494, 1995）、本発明の7回膜貫通型受容体C5L2のクローニングは行なわれていない。又、本明細書の実施例に示すように、C5L2のcDNA配列の一部を用いたcDNAライブラリーのスクリーニングでは公知の受容体遺伝子と考えられるクローンは検出されず（実施例2参照）、また、C5L2のcDNA配列の一部を用いたノーザンブロッティングによる解析では公知の受容体遺伝子と考えられる転写産物は検出されな

かった（実施例3参照）。従って、公知の遺伝子を用いたクロスハイブリダイゼーションで本発明の遺伝子をクローニングすることは困難であり、本発明のDNA断片又はRNA断片は、C5L2のcDNAやその断片、ゲノムDNAやその断片を他のDNAの中から検出する際に非常に有用である。

cDNAやゲノムDNAの検出に有用な核酸断片としては、配列番号2又は3の塩基配列、又はその塩基配列に相補的なDNAやRNAの中の連続した少なくとも12個、好ましくは16個以上、さらに好ましくは20個以上の塩基からなるDNA断片やRNA断片、あるいはこれら核酸断片の誘導体が挙げられる。核酸断片の長さは、その断片の特異性、検出しようとしている核酸との結合の安定性等によって異なる。DNA断片をプライマーとしてPCR(Polymerase Chain Reaction)法を行う場合には、 T_m （2本鎖解離温度）が45℃以上となるようなDNA断片を用いることが好ましい。PCRのようにDNA同士が結合する場合には、一つのGC結合を4℃とし、一つのAT結合を2℃として合算し、 T_m を推定することができる。従って、検出しようとする配列のGCコンテンツが高い（90%以上の）場合には連続した少なくとも12個の塩基からなる核酸断片を用い、より一般的な、GCコンテンツが約50%の配列を検出する場合には、連続した少なくとも16個の塩基からなる核酸断片が必要である。DNAとの結合がより安定な核酸誘導体をプライマー

として用いる場合には、さらに短い核酸を用いて目的のDNAを検出することが可能である。

診断目的で本発明の遺伝子の発現を調べるためには、配列番号4のDNA（配列番号3のDNAの相補鎖）や、配列番号3のDNAに相補し得るRNA、又はその中の連続した少なくとも12個、好ましくは16個以上、さらに好ましくは20個以上の塩基からなる核酸断片、つまりアンチセンスDNAやRNA、あるいはアンチセンス核酸がメチル化、メチルフォスフェート化、脱アミノ化、またはチオフォスフェート化された誘導体を用いた、ハイブリダイゼーション、プライマーエクステンション、ヌクレアーゼ・プロテクション・アッセイ、逆転写遺伝子増幅（RT-PCR）法等を採用することができる。具体的には、実施例4に示したように配列番号4の塩基配列（配列番号3のDNAに相補的なDNA）の断片を用いたC5L2のmRNAの検出が可能である。

更に、本発明の塩基配列を用いてラット等の他の生物が有する本発明の遺伝子のホモログの検出や、そのような遺伝子のクローニングが可能である。更に、本発明のDNAやRNA、及びその断片を用いれば、ヒト、マウスを含めたゲノム上の遺伝子のクローニングも同様に可能である。具体的には、トランスジェニックマウス、ジーンターゲッティングマウスや、本発明の遺伝子と関連する遺伝子を共に不活化したダブルノックアウトマウスなどの近年開発された遺伝子操作技術

を用いた研究も可能である。また、本発明の遺伝子を含むゲノムに異常があれば、遺伝子診断や遺伝子治療への応用も可能である。

本発明の7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質の更に詳細な機能を明らかにすることを目的として、細胞や生体へのアンチセンス核酸の投与も考えられる。例えば、C5L2の過剰な反応が病態となっている疾患については、アンチセンス核酸を用いて遺伝子の発現を抑えることによって治療を行うことができる。また、アンチセンス核酸を適当なベクターに組み込んで得られる組み換え体核酸を用いることもできる。このようなアンチセンス核酸の作成例・使用例については、Murray, J.A.H. ed., ANTISENSE RNA AND DNA, Wiley-Liss, Inc., 1992を参照することができる。

更に本発明によれば、上記した本発明のいずれかのDNAを含有することを特徴とする組換え体DNAが提供される。

本発明の組換え体DNAを調製する為に用いられるベクターは特に限定されないが、通常用いられるベクターを利用することができる。具体的には、大腸菌由来のpBR322、pUC8、pUC18、pUC19、pUC119（いずれも日本国、宝酒造社製）、枯草菌由来プラスミド、酵母由来プラスミド等のプラスミドベクター；λgt10、λgt11（いずれも米国、Stratagene社製）などのバクテリオファージベクター、レトロウィルスやワクシニアウィルスなどの動

物ウイルス等が挙げられるが、その他のものであっても宿主内で増殖できるものであればよい。本発明の組換え体DNAの具体的な例としては、ベクターとしてp cDNA 3.1 / Myc-His (+) Bを用いた組換え体DNA（実施例4を参照）が挙げられる。尚、本発明の7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質の全アミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドp cDNA C5L2を大腸菌DH5に遺伝子導入した形質転換細胞*E. coli*: DH5-p cDNA C5L2を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（〒305-0046日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成10年9月1日に寄託した（受託番号：FERM BP-6833）。

また、本発明の組換え体DNAは公知の宿主に導入することが好ましい。従って、本発明は組換え体DNAで形質転換された微生物又は培養細胞も提供する。

本発明の組換え体DNAを導入する宿主は特に限定されないが、本発明の組換え体DNAを発現可能な微生物又は培養細胞であればよい。具体的には、エシェリヒア

(*Escherichia*) 属菌（大腸菌）、バチルス (*Bacillus*) 属菌（枯草菌）などの原核細胞に、カルシウムクロライド法等を用いて組換え体DNAを導入することができる。上記エシェリヒア属菌の例としては、*Escherichia coli* K12、HB101、MC1061、LE392、JM109、INV α F'

が挙げられる。バチルス属菌の例としては *Bacillus subtilis* M 1 1 1 4 が挙げられる。また、ファージベクターは、例えば増殖させた大腸菌にインビトロパッケージング法 (Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 4242-4246, 1978) を用いて導入することができる。更に、動物細胞、昆虫細胞などの真核細胞も宿主として用いることができる。

更に本発明は、形質転換体によって、その細胞表面に製造された 7 回膜貫通型受容体蛋白質を提供する。具体的には、

(a) C 5 L 2 をコードする DNA を複製可能な発現ベクターに結合して、該 DNA と該複製可能な発現ベクターとを組込んでなる複製可能な組換え体 DNA を得、

(b) 該複製可能な組換え体 DNA で微生物又は培養細胞を形質転換させて形質転換体を形成せしめ、

(c) 該形質転換体を該微生物又は培養細胞の親細胞から選別し、(d) 該形質転換体を培養して、該形質転換体に該核酸を発現させる、

ことを包含する方法によって該形質転換体の細胞表面に製造された C 5 L 2 である。

形質転換体の細胞表面に C 5 L 2 を製造する際に使用する組換えベクターは、ベクターに挿入された C 5 L 2 をコードする DNA の 5' 末端に翻訳開始コドン、その 3' 末端に翻訳終止コドンを有していてもよい。翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは適当な合成核酸アダプターを用いて付加するこ

ともできる。更に、目的とするDNAを発現させるためには、DNAの上流にプロモーターを接続することが好ましい。本発明に用いられるプロモーターは、遺伝子発現に用いる宿主に対応したプロモーターであれば特に限定されない。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、*tac*プロモーター、*trp*プロモーター、*lac*プロモーターなどが好ましく、宿主がバチルス属菌である場合にはSPO1プロモーター、SPO2プロモーターなどが好ましい。宿主が原核細胞である場合には、導入する組換え体DNAはプロモーターとともにリボゾーム結合部位を有することが好ましい。又、宿主が酵母である場合にはPGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましく、宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウィルスのプロモーター、メタルチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが利用できる。

本発明のC5L2を製造する際に用いるDNAとしては、配列番号2のアミノ酸配列からなるC5L2をコードするDNAであれば特に限定されない。具体的には、配列番号1の塩基配列を用いることができる。又、特定の機能を付加したC5L2を生産するために、C5L2をコードするDNAに公知の塩基配列を結合することもできる。例えば、細胞表面への発現を保証するためにシグナルペプチドをコードするDNAを5'末端（ペプチドのN末）に付加したり、産生され

た蛋白質の検出を容易にするために抗原エピトープをコードするDNA等を付加することができる。このような技術の一例については、Choe, H. et al., Cell, 85, 1135-1148, 1996などを参照することができる。

C5L2を製造するための形質転換体は、上記のようにして構築された組換え体DNAを、ベクターを発現可能な宿主細胞に導入して得られる。宿主として用いられる細胞としては、上記したエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、動物細胞などが挙げられる。好ましい宿主は動物細胞であり、サル細胞であるCOS-7、Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO、カイコ細胞SF9などが挙げられる。本明細書の実施例5及び7で行ったように、上記の組換え体DNAを293細胞やCHO細胞に遺伝子導入して形質転換体を製造することは容易であり、形質転換体を培養することによって、C5L2を形質転換体の細胞表面に製造することができる。培養した形質転換体によるC5L2の製造は、実施例5で用いたウェスタンブロッティング法やFACS

(Fluorescence Activated Cell Sorter)によって確認することができる。

本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質を用いて、7回膜貫通型受容体蛋白質に対するリガンドのスクリーニングを行うことができる。本発明は、実質的に純粋なC5L2蛋白質、その部分配列からなるペプチド、又は形質転換体の細胞表面に

製造された C 5 L 2 を、サンプル材料と接触せしめ、C 5 L 2 あるいはそのペプチドとリガンドとの結合に対応して起きる変化を指標として、7 回膜貫通型受容体蛋白質と結合するリガンドを検出することを包含する方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法に用いられる C 5 L 2 は、精製した蛋白質でも未精製の蛋白質でもかまわないが、*in vivo* と同様のリガンド結合活性を有する必要がある。未精製の C 5 L 2 には、細胞膜画分や本発明の蛋白質を細胞膜に発現している天然の細胞や形質転換体が含まれる。

本発明のスクリーニング方法に用いられるリガンドを包含すると考えられるサンプル材料は特に限定されないが、例えば、生理的なリガンドが含まれると考えられる生体由来の組織や細胞の抽出液又は培養上清、合成化合物や微生物の培養上清を用いることができる。本発明の受容体が公知のヒトアナフィラトキシンレセプターとのホモロジーを有することと合わせて考えると、C 5 L 2 のリガンドはケモカイン群に属する物質に限らず、ソマトスタチン、アンジオテンシン、ブラディキニンなどのペプチドホルモン、あるいは補体または菌体成分などである可能性も考えられる。

C 5 L 2 に対するリガンドを検出する方法としては特に限定されないが、例えば、C 5 L 2 とサンプル材料を接触させ、その結果として生じた C 5 L 2 とリガンドとの複合体の量および／または未結合のサンプル材料の量を測定する方法

や、サンプル材料とC5L2との結合によって引き起こされる反応を測定する方法が挙げられる。複合体の量および／または未結合のサンプル材料の量を測定する方法としては、例えば、放射性化合物や色素などを用いてサンプル材料を標識してからC5L2と接触せしめ、その後、C5L2-リガンド複合体と未結合のサンプル材料とを分離し、標識を用いて複合体の量および／または未結合のサンプル材料の量を測定することができる。一例として、本明細書の実施例6では、放射標識された未結合のリガンド候補化合物の量を測定した。又、受容体と結合する物質が特定できている場合には、その物質を標識し、サンプル材料が標識物質と競合するかどうかをもって、サンプル材料の結合を測定することもできる。これらの方法の具体例は、浅沼幹人ら、実験医学11、22～29、1993年等に挙げられている。その他にも、SPA (Scintillation Proximity Assay) のように、C5L2-リガンド複合体と未結合のサンプル材料とを分離することなく、リガンドの結合量を測定する方法もある。

サンプル材料とC5L2との結合によって引き起こされる反応を測定する方法としては、C5L2が共役しているシグナル伝達系を用いた様々な方法が考えられる。このような方法として、例えば唐木英明ら編、実験医学7、26～109、1989年の記載のように、細胞内カルシウム濃度を測定する方法、Samson, M. et al., Biochem. 35, pp. 3362-3367,

1996のようにマイクロフィジオメーターを用いる方法、細胞内cAMPの量を測定する方法等が挙げられる。1例として、本明細書の実施例7では、LPS投与ラット血清を用いたC5L2形質転換細胞の化学遊走を観察した。

又、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質の部分配列からなる断片ペプチドを用いてリガンドを決定する手法としては、BIAcore®を用いた方法、樹脂カラムを用いた精製による方法などが挙げられる。BIAcore®は2つの蛋白質の会合を表面プラズモン共鳴を利用して検出する装置である（蛋白質 核酸 酵素 37、2977～2984、1992）。この場合、精製した本発明のペプチド、好ましくはN末端細胞外領域部をBIAcore®のセンサーチップ上に固定し、リガンド候補であるサンプル材料をその上に添加し、部分ペプチドとサンプル材料との結合（即ち、サンプル材料が本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質のリガンドであるかどうか）を検討する。また、本発明の部分ペプチドをカラムクロマトグラフィー用の樹脂に固定したアフィニティーカラムを作製することにより、例えば、細胞培養上清中などに存在するヒト型C5L2のリガンドをアフィニティー精製することができる。このようにして精製したリガンドの単離及び同定が可能である。

上記した本発明の全長蛋白質及びその部分ペプチドを用いたスクリーニング方法によって得られるリガンドは、7回膜貫通型受容体C5L2に作用して樹状細胞の機能を制御し、

疾患の治療を行う物質を検索する上で有用である。

更に、本発明の 7 回膜貫通型受容体 C 5 L 2 蛋白質に作用する物質、即ち、本発明の蛋白質に対するリガンドを発見した場合には、C 5 L 2 とリガンドとの作用を変化させる物質、即ち、結合によって生じる反応を活性化したり、逆に活性化を阻害する物質を検索することも可能である。具体的には、実質的に純粋な受容体 C 5 L 2 蛋白質、その部分配列からなるペプチド、又は形質転換体の細胞表面に製造された C 5 L 2 と、その蛋白質又はペプチドに対するリガンドをサンプル材料と接触せしめ、そして蛋白質又はペプチドと、リガンドとの結合に対応して起きる変化を指標として、C 5 L 2 とリガンドとの結合を阻害しうる物質を検出することを包含する方法である。

具体的なスクリーニング方法としては、例えば、本明細書の実施例 8 で行った形質転換体の化学遊走試験を採用することができる。又、C 5 L 2 に対するリガンドを決定する方法と同様に、リガンドと本発明の蛋白質又はペプチドとの結合を阻害する物質は、7 回膜貫通型受容体蛋白質に作用して樹状細胞の反応を制御し、疾患の治療を行う物質として有用である。

又、本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質の部分配列からなるペプチドを用いて、ペプチドとリガンドとの結合を阻害する物質などをスクリーニングする手法としては、リガンドを

決定する方法と同様に、BIAcore®を用いた方法などを採用することができる。

更に本発明は7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質を特異的に認識する抗体を提供する。

本発明の抗体の作成に用いられる抗原は特に限定されないが、C5L2蛋白質を特徴づけられる長さがあればよく、配列番号2に記載のアミノ酸配列の中の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる部分ペプチドを用いることが好ましく、連続した少なくとも8個のアミノ酸からなる部分ペプチドがより好ましい。このペプチドをそのまま、またはKLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) やBSA (Bovine Serum Albumin) といったキャリア蛋白質と架橋した後に必要に応じてアジュバントと共に動物へ接種せしめ、その血清を回収することでC5L2蛋白質を認識する抗体（ポリクローナル抗体）を含む抗血清を得ることができる。また、抗血清より抗体を精製して使用することも可能である。抗原を接種する動物としては、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット等が使用されるが、ポリクローナル抗体作製にはヒツジやウサギが好ましい。具体的には、実施例9で行ったように、抗ヒトC5L2蛋白質ウサギポリクローナル抗体や抗ヒトC5L2蛋白質のイムノグロブリン溶液を作成することができる。

また、ハイブリドーマ細胞を作製する公知の方法に従ってモノクローナル抗体を得ることも可能であるが、この場合に

はマウスを用いることが好ましい。また、配列番号2に示したアミノ酸配列の全長またはその中の5残基以上、好ましくは8残基以上のアミノ酸からなる部分ペプチドをGST（グルタチオン S-トランスフェラーゼ）などと融合させたものを精製して、または未精製のまま、抗原として用いることもできる。成書（“Antibodies a laboratory manual”, E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory）に示された各種の方法および遺伝子クローニング法などにより分離されたイムノグロブリン遺伝子を用いて細胞に発現させた遺伝子組換え体抗体を用いても、モノクローナル抗体を作製することができる。

本発明の抗体は7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質の精製に利用することもできる。また、7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質を特異的に認識する抗体を用いれば、C5L2の検出や定量が可能であり、細胞の分化異常を伴う疾患や自己免疫疾患、例えば悪性腫瘍、ウィルス感染、リウマチなどの疾患の診断薬として使用することができる。また、本明細書の実施例5に示すように、この検出や定量には、ウェスタンブロッティング、FACSなどの方法を用いればよい。ウェスタンブロッティングに関しては“Antibodies a laboratory manual”（E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory）のpp.471-510にその方法の詳細が、また、免疫沈降、免疫測定などに関しては、同書pp.421-470、pp.553-612にそれぞれ

詳細が記されている。FACSを用いた臨床診断の例は、例えば、天神美夫ら編「フローサイトメトリーハンドブック」(サイエンスフォーラム社、1984年)の第4部“フローサイトメトリーの臨床医学への応用”に示されており、FACSの際の細胞の染色については、高津聖志、瀧伸介著「免疫研究の基礎技術」(羊土社、1995) pp. 16～61に、操作方法については、天神美夫ら編「フローサイトメトリーハンドブック」(サイエンスフォーラム社、1984)に詳細が示されている。

更に本発明は、ヒト白血球に発現されている、7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質の発現量の測定を包含する炎症性疾患の診断方法を提供する。

本発明の7回膜貫通型受容体C5L2は、ホモロジー検索の結果などからも炎症、感染による免疫調節に深く関与していることが示唆されており、また末梢血白血球での発現が高いことから、炎症を伴う疾患の診断への応用が考えられた。初めに、白血球をリンパ球(T細胞、B細胞、単球)と顆粒球(好中球、好酸球、好塩基球)に分画し、C5L2の発現量をRT-PCRで解析した結果、配列番号2のアミノ酸配列は顆粒球に強く発現していることが判明した。次に、炎症性疾患の1つとして慢性関節リウマチ(RA)に着目し、RA患者と健常人、合わせて30症例以上の末梢血から顆粒球

を調製してR T - P C Rで解析した。また、R A患者の滑液、滑液から分画した細胞、滑膜組織片、滑膜組織片をコラーゲナーゼ処理して得られた細胞、及びこの滑膜組織片から得られた細胞から分画した白血球について、R T - P C Rによる解析を行った。その結果、C 5 L 2が滑液においても顆粒球に強く発現していること、顆粒球をほとんど含まない滑膜組織ではほとんど発現していないことが明らかとなった。

また、本発明者らは、ヒトから分離採取した体液または組織において、C 5 L 2発現量が分離採取後変化する可能性に着目し、採血直後および一定時間経過後の末梢血に含まれる顆粒球を分画して、経時的なC 5 L 2発現量の変化を解析した。具体的には、健常人から血液を採取し、その一部から比重遠心法により顆粒球画分を得た。残りの血液は室温にて静置し、一定時間経過後に新鮮血と同様に比重遠心法により顆粒球画分を得た。各顆粒球画分について、配列番号9と10の化学合成プライマーを用いたR T - P C Rによって細胞中のm R N A量を測定した。その結果、健常人末梢血由来の顆粒球においては、C 5 L 2のm R N A量は採血から6時間の間に急激に減少し、その後24時間後まで緩やかに減少していくことが判明した（図2参照）。

更に、R A患者の末梢血を上記と同様にして解析したところ、R A患者の末梢血由来顆粒球中のC 5 L 2のm R N A量は採血後24時間経っても減少しないことが明らかとなった。

顆粒球画分におけるC5L2の発現は、採血直後の新鮮血では非常に高いにもかかわらず、採血後保存している間に発現量が大きく減少する。このような現象はケモカイン受容体であるCCR4やCCR5では見られず、本発明の受容体であるC5L2に特有の現象であることが本発明者らによって初めて見出された。

顆粒球画分に見られるC5L2の発現の制御については、以下のように考えられる。ヒト末梢血の白血球における各血球の割合は、リンパ球が25～33%、単球が3～7%、好中球が55～60%、好酸球が1～3%、好塩基球が0～0.7%（生化学辞典 東京化学同人を参照）であり、換算すると顆粒球画分（好中球、好酸球および好塩基球）の9割以上は好中球である。好中球は非特異的免疫機構の一員であり、接着、走化、貪食、殺菌などの一連の機序により、病原体（主に細菌）を生体から排除する白血球である。末梢血における成熟好中球の血中滞留時間は10～16時間、寿命は2～3日であり、成熟好中球の中には血中を循環しているものと血管内皮細胞壁に付着しているものがある。その数は正常時にはほぼ同数で、成熟好中球は血管内皮細胞壁に付着後組織に遊出する。組織に遊出した成熟好中球は、口腔、消化管、肺胞などに失われたり、肝臓、脾臓、皮下などの組織でアポトーシスを起こしてマクロファージに貪食されることから、組織内出の平均寿命は1～4日程度と考えられている。一旦組

織に遊出した成熟好中球は血中には戻らず、炎症部位に向かったものはアポトーシスが制御されて寿命が長くなる。一方、細菌を貪食した好中球の寿命は短縮される。アポトーシスに陥った好中球は、走化能、食作用、形態変化、付着能、脱顆粒、活性化酸素の産生などの機能が全て低下している

[Haslett, C. et al., Chest, 99 (Suppl. 3):6S, 1991; 及び Whyte, M.K. et al., J. Immunol., 150, 5124-5134, 1993]。
好中球がアポトーシスに陥るのは、好中球の活性化が持続すると生体にとって有害であるため、このような問題を防御するための機構であると考えられている。

本発明の C 5 L 2 は普段から細胞に発現していて、感染あるいは炎症などの何らかの異常が体内で発生した場合には、C 5 L 2 を発現している細胞が異常のある部位に遊出して作用すると考えられる。即ち、炎症部位において十分に働きうる細胞に C 5 L 2 は発現していて、細胞が炎症部位に遊出して殺菌作用を開始すると、C 5 L 2 はその役目を終えて発現が低下する。また、C 5 L 2 を発現する細胞が炎症に関わりなく組織に遊出してアポトーシスに陥った場合にも、C 5 L 2 は細胞から消失すると考えられる。従って、血管内に存在する正常な状態とは多くの点で異なる採血後の血液においては、採血後の保存によって細胞活性の低下やアポトーシスの誘導が生じ、C 5 L 2 発現量が低下するのであろう。

一方、炎症部位に向かった好中球はアポトーシスが制御さ

れ寿命が長くなるという報告 (Watson, R.W. et al., J. Immunol., 158, 945-953, 1997) や、非活動期のベーチェット病患者の末梢血中の好中球のアポトーシスが抑制されている (坂根剛と岳野光洋著、「好中球 機能低下と機能亢進」、医薬ジャーナル社、1998) ことから、炎症性疾患を患う人の末梢血中の好中球も、同様にアポトーシスの抑制を受けていると考えられる。従って、細胞活性の低下やアポトーシスの誘導が生じる採血後の血液においても、炎症性疾患患者から得られた好中球はその活性を維持しているため、C5L2の発現量が健常人のように減少せずに継続していると考えられる。また、好中球の活性そのものが低下しないで維持され続けていることが、炎症の慢性化の原因とも考えられる。

以上のような鋭意研究の結果、本発明者らは、採血後のC5L2発現量の変化、または採血から一定時間経過後のC5L2発現量を測定することが、炎症性疾患のマーカーとして有用であることを見出し、本発明を完成した。

本発明の診断方法は、好中球の機能低下あるいは亢進が一因とされる炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチ、ベーチェット病、スウィート症候群や壊疽性膿皮症などの好中球性皮膚症、成人呼吸窮迫症候群 (adult respiratory distress syndrome; ARDS)、虚血再灌流障害、敗血症性ショック症候群、全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS)、肺炎等の診断に有用であるが、好ましくは

リウマチ、特に好ましくは慢性関節リウマチの診断に用いることができる。現在用いられているリウマチのマーカーは6週間の長期にわたる観察が必要であったが、C5L2の発現量をマーカーとして用いる本発明の診断方法を用いると、診断結果が数日で得られるため、早期診断が可能である。

また、本発明の診断方法は慢性炎症性疾患の検出にも有用である。好中球のアポトーシスおよびそれに続くマクロファージによる貪食は正常な免疫反応に不可欠のものであり、好中球が活性を維持し続けることは炎症の慢性化を示す指標となる。従って、C5L2の発現は慢性炎症性疾患のマーカーとなる。また、潰瘍性大腸炎やクローン病のように増悪寛解を繰り返す炎症性疾患においては、C5L2の発現量から疾患が活動期であるか否かを判断することもできる。

本発明の診断方法に用いる細胞としては白血球が好ましく、特に顆粒球が好ましい。炎症部位において十分に働いている細胞である顆粒球はC5L2を常時発現しており、細胞の活性が低下するとC5L2の発現も消失すると考えられる。従って、上記したように、健常者の顆粒球は採血後には経時的にC5L2の発現量が低下する。特に炎症性疾患の罹患患者と健康人との差を明確に検出するためには、診断に用いる顆粒球は、少なくとも6時間前に採取した顆粒球であることが好ましい。

C5L2の発現量を定量する方法は特に限定されないが、

白血球中に存在するC5L2のmRNAを定量する方法や細胞表面に存在する蛋白質を定量する方法が挙げられる。遺伝子から転写されたmRNAは、細胞内のメカニズムによって蛋白質へと翻訳されるので、mRNA量から蛋白質量を推定することができる。C5L2をコードするmRNAの定量に用いる方法は特に限定されないが、RT-PCR（逆転写PCR）法を用いることが好ましい。RT-PCR法とは、逆転写酵素を用いてmRNAからcDNAを合成した後、耐熱性DNAポリメラーゼとC5L2に特異的な2種類のプライマーを用い、mRNAから合成したcDNAを増幅する方法である。増幅された核酸量から細胞中に含まれていたmRNA量を相対的に求めることができる。

RT-PCRに用いるプライマーとしては、本発明のDNA断片、即ち、配列番号3又は4のDNAの中の連続した少なくとも12個、好ましくは16個以上、さらに好ましくは20個以上の塩基からなるDNA断片、あるいはその誘導体が挙げられる。具体的には、配列番号9及び10に記載のプライマーを用いることができる。C5L2のmRNAを定量する方法としては、本明細書の実施例11で行った方法を用いることができる。具体的には、配列番号9及び10のプライマーを用いてC5L2のmRNAを検出し、更に配列番号11及び12のプライマーを用いて同一サンプル中のG3PDHを検出する。C5L2をコードするmRNAの量は、G

3PDHのPCR産物量を100%とした相対値（発現率）として求めることができる。

細胞表面に存在する蛋白質を定量する方法としては、C5L2を特異的に定量することができる方法であれば特に限定されないが、本発明のC5L2に特異的に結合しうる抗体を用いることが好ましい。具体的には、本明細書の実施例9で作成したような、配列番号2に記載のアミノ酸配列の中の連続した少なくとも5個以上のアミノ酸からなる部分ペプチドを抗原として用いて得られた抗体を用いることができる。抗体を用いたC5L2蛋白質の発現量の定量方法としては、実施例11に示すFACSや免疫沈降などの方法を用いることができる。FACSを用いた臨床診断の例は、例えば、天神美夫ら編「フローサイトメトリーハンドブック」（サイエンスフォーラム社、1984）の第4部、フローサイトメトリーの臨床医学への応用、を参照することができる。更に、免疫沈降、免疫測定などに関しては、“Antibodies a laboratory manual”（E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory）のpp.421-470とpp.553-612にそれぞれ詳細が記されている。

また、炎症を起こしている関節の滑液などの炎症部位を取りまく体液中には、7回膜貫通型受容体蛋白質（例えば、CD97）の細胞外ドメインが可溶化して、安定な状態で遊離している例が報告されている（James X. Gray et al., J. Immunol., 157, 5438-5447, 1996）。血液や滑液中に遊離して

いるC5L2蛋白質あるいはその部分ペプチドを定量することも炎症性疾患の診断には有効な手段となる。この場合も、上記したように、本発明のC5L2に特異的に結合しうる抗体を用いることが好ましく、C5L2蛋白質の定量法としては、ウェスタンブロッティングやFACSなどを採用することができる。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明の実施の形態を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

実施例 1

新規な 7 回膜貫通型受容体遺伝子断片の取得

1 リットルの健常人末梢血からパフィーコートを回収して得た有核細胞を、37℃、5%炭酸ガス雰囲気下で14日間培養して未成熟樹状細胞に分化させた。培地は、10%牛胎児血清(FBS)(米国、Intergen社製)、100 ng/ml ヒトGM-CSF、50 ng/ml ヒトIL-4並びに1×抗生物質-抗真菌剤(100 IU/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン及び0.25 μg/ml アンフォテリシンB)(米国、GIBCO BRL®)を含むRPMI 1640培地を使用した。これにより、末梢血白血球から1×10⁷個の未成熟樹状細胞を得た。

得られた未成熟樹状細胞を回収してPBS(Phosphate Buffered Saline) 30 mlに懸濁後、Quick Prep mRNA Purification Kit(スウェーデン国、Pharmacia Biotech社製)を用い、second column purificationを行わない以外はプロトコルに従ってmRNAを抽出した。次に、抽出したmRNA 1 μgを用い、SuperScript Choice System for cDNA Synthesis(米国、Life Technologies社製)及びそのプロト

コルに従ってcDNAを合成し、更に、oligo(dT)プライマーを用いてcDNAを2本鎖(dsDNA)にした。フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った後、dsDNAを40 μ lの滅菌水に溶解してcDNAサンプルとした。

cDNAサンプルをPCRにかけて増幅した。具体的には、cDNAサンプル2 μ lに、DNAポリメラーゼとして5U/ μ l TaKaRa Taq (コードR001A) (日本国、宝酒造社製)を0.5 μ l、ポリメラーゼに添付の10 \times PCRバッファーとdNTP mixture (各ヌクレオチドの濃度: 2.5mM)をそれぞれ5 μ lと4 μ l、並びにプライマーとして配列番号5と6に示した合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ200pmol加え、最終容量を50 μ lとした。PCRは、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 (日本国、宝酒造社製)を用いて、95 $^{\circ}$ C 1分、40 $^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 3分のサイクルを5サイクル行った後、95 $^{\circ}$ C 1分、50 $^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 3分のサイクルを25サイクル行った。得られたPCR産物の一部を1.5%アガロース・ゲルによる電気泳動に付し、約700bpのcDNAが増幅されていることを確認した。このバンドをゲルから切り出して GENE CLEAN II Kit (米国、BIO 101社製)を用いて精製し、得られたcDNA断片を TA cloning kit (米国、Invitrogen社製)を用いて pCR2.1ベクター (米国、Invitrogen社製)に組み込んだ。cDN

60

Aを組み込んだ p C R 2 . 1 ベクターで大腸菌 One Shot Competent Cells (米国、Invitrogen 社製) を形質転換し、アンピシリン耐性を指標として形質転換体 (即ちクローン) を回収し、Wizard[®] Minipreps (米国、Promega 社製) のプロトコルに従ってプラスミドを精製した。精製したプラスミドを制限酵素 *E c o R I* で消化し、約 7 0 0 b p の DNA が切り出されてくることで上記の P C R 産物がベクターに組み込まれていることを確認した。

精製したプラスミドについて、組み込んだ c D N A 断片の塩基配列を蛍光シーケンサー (米国、Applied Biosystems 社製) を用いて決定した。シーケンスサンプルの調製には PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (米国、Applied Biosystems 社製) を用いた。具体的には、0 . 5 m l 容量のマイクロチューブに反応ストック液を 9 . 5 μ l、0 . 8 p m o l / μ l の T 7 プロモータープライマー (米国、GIBCO BRL[®]) を 4 . 0 μ l、及び 0 . 1 6 μ g / μ l シーケンス用鋳型 DNA を 6 . 5 μ l 加えて混合し、1 0 0 μ l のミネラルオイルを重層後、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 を用いて P C R を行った。反応条件は、9 6 $^{\circ}$ C 3 0 秒、5 5 $^{\circ}$ C 1 5 秒および 6 0 $^{\circ}$ C 4 分を 1 サイクルとする反応を 2 5 サイクル行なった後、4 $^{\circ}$ C で 5 分間保温した。反応後の混合溶液に、8 0 μ l の滅菌精製水を加えて攪拌し、水相を遠心分離した後、その水層についてフェノール

61

／クロロホルム抽出を3回行った。更に、室温でエタノール沈殿を行った後、沈殿したDNAを乾燥させた。10 mM EDTAを含むホルムアミド4 μ lにDNAを溶解して90℃で2分間変性後、水中で冷却してシーケンス用サンプルとした。

約250のクローンについてDNAの塩基配列を決定したところ、そのうち1個のクローンが配列番号1の235～852番目に対応する塩基配列を有していた。GenBank（リリース106.0、April、1998）を用いてホモロジー検索を行った結果、この配列は7回膜貫通型受容体群と類似していることが判明した。

実施例 2

新規な7回膜貫通型受容体全長遺伝子の取得

ヒト胎盤組織由来のcDNAライブラリー（米国、CLONTECH社製）からブランクハイブリダイゼーションにて本発明の7回膜貫通型受容体の全長cDNAを有するクローンを単離した。具体的には、 10^6 個のファージを常法に従ってプレートに蒔き、出現したブランクをナイロンフィルターHybond N+（英国、Amersham社製）に転写した。転写したナイロンフィルターを、アルカリバッファー（1.5 M NaCl / 0.5 M NaOH）を染み込ませた濾紙上に5分間放置してアルカリ処理を行い、中和バッファー（1.5 M

NaCl / 0.5 M Tris-HCl、pH 7.5) を染み込ませた濾紙上にアルカリ処理を行ったナイロンフィルターを5分間放置して中和処理を行った。なお、中和処理は2回繰り返した。中和処理後のフィルターについて2×SSC溶液(1×SSC溶液は、0.15 M NaCl / 15 mM クエン酸、pH 7.0) 中で5分間の振とう洗浄を2度行った後、風乾した。その後、UVクロスリンカー CL-1000型(日本国、フナコシ社製)を用いて、このフィルターに紫外線を $1,200 \times 160 \mu\text{J} / \text{cm}^2$ で照射し、DNAを固定した。

次に、実施例1で得られた受容体遺伝子断片を放射性同位元素 ^{32}P で標識したプローブを作製した。受容体遺伝子断片が組み込まれたpCR2.1ベクターをEcoRIで消化し、得られたEcoRI断片(約700bp)を0.8%アガロース・ゲルで電気泳動して分離した後、ゲルから切り出してGENECLEAN II Kitを用いて精製した。精製したEcoRI断片を、Megaprime DNA labeling system(コードRPN1607)

(英国、Amersham社製)を用い、そのプロトコルに従って α - ^{32}P -dCTP(コードAA 0005)(英国、Amersham社製)で標識した。次にQuick SpinTM Column Sephadex[®] G-50(ドイツ国、ベーリンガー・マンハイム社製)で標識したDNAを精製し、5分間の沸騰水浴の後、2分間氷冷してプローブとした。

63

DNAを固定したフィルターに対して ^{32}P で標識した受容体遺伝子断片プローブによるハイブリダイゼーションを行った。上記のDNA固定フィルターを、 $6\times\text{SSC}$ 溶液、 $5\times$ デンハルト液、 0.5% SDS (sodium dodecyl sulfate) 及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション液中に浸し、 65°C にて2時間振とうした後、上記の ^{32}P 標識されたプローブをハイブリダイゼーション液に添加して 65°C で16時間振とうしてハイブリダイゼーションを行った。

次に、フィルターを 0.1% SDSを含む $2\times\text{SSC}$ 溶液に浸して室温で3回洗浄し、さらに同じ溶液を用いて室温で15分間洗浄後、 -85°C でオートラジオグラフィーを行った。オートラジオグラフィーにおいて、強く露光された部分に対応するファージクローンを拾った。このファージを蒔き直し、上記と同様の方法にてスクリーニングを行い、完全に単一のクローンを分離した。

単離されたファージクローンのうち2クローンを用いて新規な7回膜貫通型受容体の全長遺伝子の塩基配列を決定した。常法に従い、これら2クローンのファージをそれぞれ約 10^9 pfu (plaque forming unit) に調製し、Wizard® Lambda Preps (米国、Promega社製) を用いてファージDNAを精製後、*EcoRI*で消化してDNA断片を得た。同様に*EcoRI*で消化したプラスミド pBluescript II KS(+)

(米国、Stratagene 社製) を調製し、ファージ DNA の *EcoRI* 断片をそこに組み込んだ。DNA を組込んだクローンの塩基配列を蛍光シーケンサーにより解析し、新規な 7 回膜貫通型受容体の全長遺伝子、即ち、配列番号 3 に示す塩基配列を決定した。この新規な 7 回膜貫通型受容体を本発明者らは C5L2 と命名した。配列番号 3 の中で C5L2 蛋白質をコードしている部分の塩基配列のみを配列番号 1 に記載した。又、この C5L2 蛋白質をコードしている DNA を含むプラスミドを pBSC5L2 と命名した。

実施例 3

ノーザンブロッティングによる解析

実施例 2 で遺伝子の全長塩基配列が得られたヒト 7 回膜貫通型受容体 C5L2 の各臓器における mRNA の発現をノーザンブロッティングで解析した。各臓器の RNA を固定したフィルターとして、Multiple Tissue Northern (MTN) Blots フィルター (Cat. # 7757-1、#7759-1、#7760-1 及び #7767-1) (米国、CLONTECH 社製) を用いた。プローブとしては、C5L2 遺伝子の 3' 末端側の *NaeI*-*EcoRI* 断片を実施例 2 と同様の方法で ^{32}P 標識したものをを用いた。上記のフィルターを $5\times\text{SSPE}$ 溶液 ($1\times\text{SSPE}$ 溶液は、 $0.15\text{M NaCl}/10\text{mM NaH}_2\text{PO}_4/1\text{mM EDTA}$ 、 $\text{pH } 7.4$)、 $10\times$ デンハルト液、 2% SDS、

6 5

50%ホルムアミド、及び100 μ g/mlサケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション液中に浸し、50℃にて2時間振とうした。次にプローブをハイブリダイゼーション液に添加し、50℃にて16時間振とうしてハイブリダイゼーションを行った。

フィルターの洗浄は、0.1% SDSを含む0.1 \times SSC溶液中で、50℃、20分間を2回、60℃、20分間を1回行った。洗浄後のフィルターについて、-85℃でオートラジオグラフィーを行った。その結果、末梢血白血球及び脾臓において、C5L2に相当する約2.4kbの非常に強いバンドが検出された。また、骨髄、リンパ節、脊髄、腎臓、肝臓、肺、胎盤および心臓でも弱いバンドが確認された。ややサイズの大きいバンドが末梢血白血球、脾臓および精巣で確認された。脳、骨格筋、膵臓、胸腺、前立腺、胃、甲状腺、気管、副腎、胎児脳、胎児肺、胎児肝および胎児腎臓ではいずれのバンドも検出されなかった。

未成熟樹状細胞でも約2.4kbのバンドが検出されたが、成熟した樹状細胞ではこのバンドは検出されなかった。このことから、C5L2の発現は樹状細胞の成熟にしたがって消失することが示された。

実施例 4

7 回膜貫通型受容体 C 5 L 2 発現ベクターの作製

実施例 2 で単離した C 5 L 2 全長遺伝子を含むプラスミドクローン (p B S C 5 L 2) を鋳型として、C 5 L 2 遺伝子の P C R を行った。P C R には High Fidelity Taq ポリメラーゼ (ドイツ国、ベーリンガー・マンハイム社製) を用いた。5 n g / μ l の p B S C 5 L 2 溶液 1 μ l に T a q ポリメラーゼ 0 . 5 μ l 、ポリメラーゼに添付の 1 0 \times バッファー 5 μ l 及び 2 . 5 m M dNTP mixture (日本国、宝酒造社製) 4 μ l を加え、更にプライマーとして、配列番号 7 に示したオリゴヌクレオチド (配列番号 1 の 1 ~ 2 2 番目の塩基配列の 5 ' 末端にスパーサー配列 G G G G と制限酵素 *H i n d* III の認識配列 A A G C T T を加えたもの) と配列番号 8 に示したオリゴヌクレオチド (配列番号 4 の 2 0 6 ~ 2 2 5 番目の塩基配列の 5 ' 末端にスパーサー配列 G G G A と制限酵素 *S a c* II の認識配列 C C G C G G を加えたもの) をそれぞれ 2 0 p m o l 加え、滅菌水を加えて最終容量を 5 0 μ l とした。

この混合物を、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 を用いて、9 6 $^{\circ}$ C 1 分、6 0 $^{\circ}$ C 1 分、7 2 $^{\circ}$ C 2 分のサイクルを 2 0 サイクル行った後、7 2 $^{\circ}$ C 7 分の反応を行った。得られた P C R 産物の一部を 0 . 8 % アガロース・ゲルを用いた電気泳動に付し、約 1 , 1 5 0 b p の c D N A が増幅されていることを確認した。常法に従い、P C R 産物をフェノール / クロロホルム抽出に付し、更にエタノール沈殿に付して、沈殿物である D N A を回収した。回収した D N A を滅菌水に溶解して D

NA 溶液を得た。次に、得られた DNA 溶液を *Hind* III、*Sac* II で順次処理し、0.8% アガロースゲル上で分離後、*Hind* III - *Sac* II 断片をゲルから切り出して GENE CLEAN II Kit を用いて精製した。p c DNA 3.1 / Myc - His (+) B も上記と同様に *Hind* III、*Sac* II で消化後精製した。C5L2 の *Hind* III - *Sac* II 断片を p c DNA 3.1 / Myc - His (+) B の *Hind* III - *Sac* II 断片切り出し部位に挿入し、DNA Ligation Kit Ver. 2 (日本国、宝酒造社製) を用いて連結して C5L2 組換えプラスミドを得た。得られたプラスミドで大腸菌 DH5 コンピテントセル (日本国、宝酒造社製) を形質転換した。アンピシリン耐性を指標として形質転換体 (即ちクローン) を回収し、Wizard[®] Minipreps (米国、Promega 社製) を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離した。分離したプラスミドを制限酵素 *Hind* III と *Sac* II で消化し、約 1,150 bp の DNA が切り出されてくることで、C5L2 遺伝子がベクターに組み込まれていることを確認した。C5L2 遺伝子を組込んだ組換え体 DNA を、p c DNA C5L2 と命名した。

なお、p c DNA C5L2 を大腸菌 DH5 に導入した菌株 *E. coli* : DH5 - p c DNA C5L2 は、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成10年9月1日に寄託した (受託番号: FERM BP-6833)。

実施例 5

発現ベクターによる細胞の形質転換とその発現

実施例 4 で作製した p c D N A C 5 L 2 で 2 9 3 細胞（大日本製薬社から入手可能、A T C C 番号 C R L - 1 5 7 3）を形質転換（トランスフェクト）した。2 9 3 細胞の培養には、1 0 % 馬血清（Cat. No. 2921149）（米国、ICN Biomedicals 社製）と 1 容量 % の Penicillin-Streptomycin 溶液（Cat. No. 16-70D-49DN）（日本国、大日本製薬社製）とを含む M E M アール液体培地（MEM with Earles Salts; Cat. No. 12-102-54CN）（日本国、大日本製薬社製）を用い、3 7 °C、5 % 二酸化炭素、湿度 1 0 0 % の環境下で培養した。形質転換には、Calcium Phosphate Transfection Kit（Cat.No.IV2780-1）（米国、Invitrogen 社）を用い、プロトコルに従ってリン酸カルシウム共沈法により行った。尚、コントロールとして p c D N A 3 . 1 / M y c - H i s（+）B ベクターでも形質転換を行った。組換え体 D N A（又はベクターのみ）は、3 5 m m プレート当たり 5 μ g を用いた。

上記の形質転換体の膜画分を以下のように調製した。形質転換体（p c D N A C 5 L 2 形質転換体とコントロール）を 4 8 ~ 7 2 時間培養し、P B S で細胞を洗浄した後、1 m l / プレートの E D T A（終濃度 0 . 0 1 %）を含む P B S を培養細胞に加えた。Cell Scraper-L（Cat. No. MS-93300）

(日本国、住友ベークライト社製)を用いて細胞をプレートから剥がした。プレートから剥がした細胞をPBSで2回洗浄後、コンプリートTM(プロテアーゼインヒビターカクテル錠)(ドイツ国、ベーリンガー・マンハイム社製)の25 mM HEPES (pH 7.4) 溶液0.5 mlで懸濁し、マイクロチューブに移した。26 G注射針を付けたシリンジで細胞懸濁液をホモゲナイズ後、マイクロチューブ用遠心機(MRX-150型)(日本国、トミー精工社製)で4℃、3,000 rpmで5分間遠心した。遠心分離によって得られた上清を回収し、回収した上清を更に15,000 rpmで15分間遠心して沈殿物を回収した。この沈殿物を、HMS液(50 mM HEPES、pH 7.4 / 5 mM MgCl₂ / 150 mM NaCl)で2回洗浄後、100 μlのHMS液に懸濁した。この懸濁液を膜画分調製液とした。

次に、得られた膜画分調製液を用いて、ウェスタンブロッティング法にて7回膜貫通型受容体C5L2蛋白質の発現を確認した。具体的には、膜画分に2-メルカプトエタノールを加え、5分間の沸騰水浴加熱による還元処理を行った後、5~15%のグラジエントゲルを用いてSDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)を行った。分子量マーカーは、レインボーマーカー(高分子レンジ)(英国、Amersham社製)を用いた。SDS-PAGE終了後、アクリルアミドゲル中の蛋白質をイミューンブロットPVDFメ

70

ンブレン（イムノプロット用）（米国、Bio-Rad Laboratories 社製）にミニトランスプロットセル（米国、Bio-Rad Laboratories 社製）を用いて転写した。蛋白質を転写したフィルターをブロックエース（日本国、大日本製薬社製）液に浸し、4℃で一晩振とうしてブロッキングした。TBS-T（20 mM Tris-HCl、pH 7.6 / 137 mM NaCl / 0.1% Tween 20）でフィルターを洗浄後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム（英国、Amersham 社製）を用い、プロトコルに従ってウェスタンブロッティングを行った。一次抗体としては実施例 9 で作成した抗 C5L2 抗血清を用い、二次抗体としてはペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体（英国、Amersham 社製）を用いて、それぞれ室温で一時間反応させた。各抗体との反応の後のフィルターに対して、TBS-T を用いて室温で 10 分間の振とう洗浄をそれぞれ 3 回行った。洗浄後のフィルターを ECL ウェスタンブロッティング検出システムの反応液に 5 分間浸し、その後 X 線フィルムに感光させた。その結果、pcDNA C5L2 を導入した細胞の膜画分では、約 38 ~ 42 kD のバンドが検出されたが、pcDNA 3.1 / Myc-His (+) B ベクターのみを導入した細胞の膜画分ではバンドが検出されなかった。

実施例 6

リガンドのスクリーニング

p c D N A C 5 L 2 を導入した 2 9 3 細胞とコントロールとして p c D N A 3 . 1 / M y c - H i s (+) B ベクターを遺伝子導入した 2 9 3 細胞から、実施例 5 と同様の方法でそれぞれの膜画分を調製した。リガンド候補化合物としては、GPCR の 1 つである A_{2A} 受容体の特異的アゴニストとして知られている C G S 2 1 6 8 0 を用いた。膜画分調製液 50 μ l に、放射性標識された C G S 2 1 6 8 0 (カタログ番号 NET-1021) (米国、DuPont NEN 社製) を 50 μ l (終濃度 100 nM) と、PBS を 50 μ l とを加えて全量を 150 μ l とし、混合することにより候補化合物を C 5 L 2 蛋白質に接触させ、37℃で30分間保温した。保温後の混合液をマイクロチューブ用遠心機で室温、15,000 rpm で15分間遠心分離することにより、C 5 L 2 蛋白質に結合していない候補化合物を分離した。未結合の候補化合物を含む上清を1 μ l とり、10 ml の液体シンチレーター用カクテル ECONOFLUOR-2 (米国、DuPont NEN 社製) に加えて混合した後、Beckman LS6000LL 型シンチレーションカウンター (米国、Beckman 社製) を用いて放射活性をカウントし、未結合の候補化合物量を測定した。

その結果、C 5 L 2 形質転換細胞とコントロールとして用いた細胞との間で放射活性に差はみられなかった。

実施例 7

リガンドのスクリーニング

実施例 4 で作製した p c D N A C 5 L 2 を C H O 細胞（大日本製薬社から入手可能、A T C C 番号 C C L - 6 1）に遺伝子導入した。C H O 細胞の培養は、10%の F B S（Cat. No. 10099-141）（米国、GIBCO BRL®）、1 容量%の Penicillin-Streptomycin を含む F-12 Nutrient Mixture（Ham's F-12）（Cat. No. 11765-047）（米国、GIBCO BRL®）を用いて、37℃、5%二酸化炭素環境下で行った。遺伝子導入は、Calcium Phosphate Transfection Kit を用い、添付のプロトコルに従ってリン酸カルシウム共沈法で行った。DNA は 35 mm プレート当たり 5 μ g 用いた。

遺伝子導入後の細胞は、400 μ g/ml ジェネティシン（Cat. No. 11811-023）（米国、GIBCO BRL®）を含む培地に種々の細胞濃度で植え替えた。2 週間程培養して増殖した細胞を C 5 L 2 発現細胞とした。

上記の C 5 L 2 発現 C H O 細胞を用いて、化学遊走の測定を行った。リガンド候補物質を含むサンプル材料としては、以下のように調製した L P S（lipopolysaccharide）投与ラット血清を用いた。サルモネラミネソタ R e 5 9 5 由来 L P S（米国、SIGMA®）を最終濃度 1 mg/ml になるように生理食塩水に懸濁し、ソニケーター（日本国、Branson 社製）でソニケートして透明な液とした。これを生理食塩水で 10

73

倍に希釈し、 $400\mu\text{l}$ を7週令のWistarラット（株）日本生物材料より購入）の尾静脈より投与した。投与後約22時間後のラットをエーテル麻酔して開腹し、心臓より採血した。得られた血液をマイクロチューブ用遠心機で 4°C 、 $13,000\text{rpm}$ で15分間遠心し、その上清をリガンド候補物質を含むサンプル材料とした。

96穴マイクロプレートチャンバー（カタログ番号FE-2292-96）（日本国、フナコシ社製）に96穴マイクロプレート（カタログ番号FE-2300-02）（日本国、フナコシ社製）および $15\mu\text{g}/\text{ml}$ フィブロネクチン（米国、SIGMA[®]）を含むPBSで処理したフレームフィルター（ポアサイズ： $8\mu\text{m}$ ）（カタログ番号FE-2340-08）（日本国、フナコシ社製）を据え付けた。下室には、サンプル材料を0.15%BSA（bovine serum albumin）を含むRPMI 1640培地（Cat. No. 22400-071）（米国、GIBCO BRL[®]）で10倍に希釈して加えた。上室には、0.15%BSAを含むRPMI 1640培地に懸濁したC5L2蛋白質発現CHO細胞を加え、5%二酸化炭素、 37°C で5時間保温して、サンプル材料をC5L2蛋白質に接触させた。その後、フィルターを固定及び染色して顕微鏡下で観察した。その結果、化学遊走している細胞が観察され、LPS投与ラット血清にはリガンド候補化合物が含まれることが明らかとなった。

実施例 8

リガンドと拮抗する物質のスクリーニング

C5L2 遺伝子で形質転換した CHO 細胞を用いて細胞増殖試験を行った。初めに、実施例 7 と同様に（即ち、実施例 7 で作製した C5L2 蛋白質を発現する形質転換 CHO 細胞に、LPS 投与ラット血清を添加して）化学遊走している細胞を観察した。次に、上室および下室の培地に、リガンドと拮抗する物質の候補として、GPCR のアンタゴニストの 1 つである NECA [5' - (N-エチルカルボキシアミド) アデノシン]（米国、SIGMA®）を最終濃度 100 μ M となるように加える以外は実施例 7 と同様に化学遊走している細胞を観察した。リガンドと拮抗する物質の候補の非存在下における化学遊走と、リガンドと拮抗する物質の候補の存在下における化学遊走を比較したところ、両者に差はみられなかった。

実施例 9

C5L2 蛋白質を認識する抗体の作成

配列番号 2 のアミノ酸配列の中の 6 ~ 32 番目のアミノ酸からなるペプチドを合成した。その際、キャリアー蛋白質との結合反応を高めるために、N 末端にシステイン残基を導入した。次に、Imject Activated Immunogen Conjugation Kit with KLH and OVA (Cat. No. 77108)（米国、PIERCE 社製）

を用いてKLH (Keyhole limpet hemocyanin) とOVA (Ovalbumin) と合成ペプチドとをコンジュゲートし、免疫原とした。得られた免疫原をウサギに免疫し、抗体価の測定後に全血を採血して、血清を採取した。採取した血清から、エコノパック血清IgG精製キット (米国、Bio-Rad Laboratories 社製) を用い、添付の取扱説明書に従って抗ヒトC5L2蛋白質ウサギポリクローナル抗体を精製した。

また、配列番号2のアミノ酸配列の中の1～23番目のアミノ酸からなるペプチドを合成し、上記と同様にしてウサギを免疫して、その血清を採取した。血清から抗体タンパク質を硫酸沈殿により粗精製し、透析によってPBSにバッファ交換した。抗原ペプチドを添付のマニュアルに従って固定したAF-Tresyl TOYOPEARL ゲル (日本国、東ソー株式会社製) カラムに、精製抗血清の一部を通して抗原ペプチドに抗体タンパク質を結合させ、1.0Mグリシン塩酸バッファ (pH 2.5) でカラムからイムノグロブリンを溶出した。イムノグロブリン溶液を透析によりPBSにバッファ交換した。この溶液には結合性の高い抗C5L2イムノグロブリンが含まれており、これをアフィニティー精製抗C5L2抗血清溶液とした。このアフィニティー精製抗C5L2抗血清溶液中の蛋白質0.3mgに対し、EZ-Link (cat. No. 21338) (米国、PIERCE 社製) を添付のマニュアルに従って反応させて、イムノグロブリンのビオチン化を行った。

実施例 10

樹状細胞による C 5 L 2 蛋白質発現のフローサイトメーターによる検出

健常者から末梢血を採取し、フィコールで単核細胞層を回収した。得られた単核細胞をさらに培養シャーレ

(FALCON®) 中で培養し、その後付着細胞を回収した。この付着単核細胞を 37℃、5% 炭酸ガス雰囲気下で培養した。尚、未成熟樹状細胞を得る場合は 7 日間、成熟樹状細胞を得る場合は 11 日間培養して単核細胞を分化させた。培地には、10% FBS (米国、Intergen 社製) と 1×抗生物質-抗真菌剤とを含む RPMI 1640 培地を用い、培養開始後 7 日間は更に刺激因子としてヒト GM-CSF (終濃度 100 ng/ml) とヒト IL-4 (終濃度 50 ng/ml) とを添加した培地を使用し、7 日目以降の培養には更にヒト TNF- α (終濃度 10 ng/ml) を添加した培地を使用し、健常者の末梢血から樹状細胞を調製した。

上記の培養方法によって得られた樹状細胞について、細胞表面に発現した C 5 L 2 蛋白質をフローサイトメーターを用いて検出した。樹状細胞の標識は以下のようにして行った。細胞をマウス正常血清 (デンマーク国、DAKO 社製) を含む PBS に懸濁し、一次標識としてビオチン化標識した抗 C 5 L 2 抗血清を添加して 4℃ で 30 分間反応させた。ネガティブ

コントロールには、一次標識としてビオチン化標識したウサギ Ig G 抗体を用いた。一次標識した細胞を PBS で 2 回洗浄した。次に、二次標識として FITC 標識アビジン（米国、Beckton-Dickinson 社製）を洗浄後の細胞に添加して 4℃ で 30 分間反応させた。その後、細胞を洗浄して標識細胞を得、FACS Calibur（米国、Beckton Dickinson 社製）にて蛍光強度を測定した。

図 1 に、樹状細胞の細胞表面に発現している C5L2 を FACS で測定した結果を示す。その結果、C5L2 は未成熟樹状細胞において発現が高く、成熟樹状細胞ではそれに比べて発現が低かった。このことから、本発明の新規な 7 回膜貫通型受容体 C5L2 は、未成熟樹状細胞には発現しているが、成熟樹状細胞では発現が減少することが示された。

実施例 11

慢性関節リウマチ（RA）患者の末梢血における C5L2 遺伝子の発現

（1）末梢血単核球及び顆粒球の調製

末梢血の血液細胞の分画は次のように行った。最終濃度 20 U/ml となるようにヘパリンを添加したヒト末梢血 10 ml を、RPMI 1640 の無血清培地（以下、屢々、単に“RPMI-0”と称す）で 3 倍に希釈した。あらかじめ Ficoll-Paque（スウェーデン国、Pharmacia Biotech 社製）

78

を10ml入れておいた50ml容量の遠心管に希釈した末梢血を重層し、遠心機のブレーキを解除した状態で、20℃、 $400 \times g$ で40分間遠心した。末梢血単核球(PBMC)は上層とフィコール層の境目にバンドを形成し、顆粒球は赤血球と共に遠心管の底に沈殿した。PBMC層をパスツールピペットで回収した後、上層とフィコール層を吸引除去して、沈殿した赤血球と顆粒球を得た。回収したPBMC層をRPMI-0で2倍以上に希釈して、4℃、 $250 \times g$ で5分間遠心して細胞を集め、これをPBMC画分とした。赤血球と顆粒球を含む画分については、RPMI-0を加えて全容量を10mlにした。これに、0.9% NaClで調製した3%のdextran T-500溶液10ml(室温)を加えて良く混和し、室温で30分ほど静置して赤血球を沈殿させた。顆粒球を含む上層を回収して4℃、 $250 \times g$ で8分間遠心した後、上清を捨てた。残留する液で細胞ペレットを良くほぐした後、冷えた0.2% NaCl溶液を7ml加えて良く混和し、溶血させた。30秒後、冷えた1.6% NaCl溶液を7ml加えて混和し等張に戻した後、4℃、 $250 \times g$ で8分間遠心して細胞を集めた。得られた細胞を顆粒球画分とした。

PBMCと顆粒球の純度は、それぞれフローサイトメーターで検定した。細胞染色は、まず $5 \sim 10 \times 10^4$ 個の細胞を1.5ml容量のチューブに取り、1% BSA/PBS

に懸濁して遠心した。沈殿した細胞画分に、1% BSA / PBS で20倍に希釈した蛍光標識抗体を加え、4℃で30分間反応させた。蛍光標識抗体には、T細胞検出用にFITC標識抗ヒトCD3抗体（クローン：HIT3a；Cat.No.30114X）（Pharmingen社製）、B細胞検出用にPE（phycoerythrin）標識抗ヒトCD19抗体（クローン：HIB19；Cat.No.30655X）（Pharmingen社製）、PBMC検出用にFITC標識抗ヒトCD14抗体（クローン：M5E2；Cat.No.30544X）（Pharmingen社製）、顆粒球検出用にFITC標識抗CD66b抗体（クローン：G10F5；Cat.No.33734X）（Pharmingen社製）をそれぞれ反応させて細胞を標識した。反応後、細胞を1% BSA / PBS で洗浄し、30μmのナイロンメッシュに通して、FACS Caliburで蛍光強度を測定することにより純度を検定した。

(2) RNAの調製

上記のようにして調製したPBMCと顆粒球から、次のような方法でRNAを抽出した。5～10×10⁶個の細胞を1.5ml容量のチューブに取り、PBS（-）0.5mlで2回洗浄した。洗浄後はできるだけPBS（-）を除去し、4M GITC溶液（4M guanidine isothiocyanate / 25mM sodium citrate、pH7 / 0.5% sodium N-lauroylsarcosinate）400μlと2-メルカプトエタノー

80

ル $2 \mu\text{l}$ とを加えて室温で 10 分間攪拌した。20 G の注射針を付けた 1 ml のシリンジを用いて、細胞が溶解した GITC 溶液中のゲノム DNA を剪断した。次に、 $40 \mu\text{l}$ の 2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.2)、 $440 \mu\text{l}$ の水飽和フェノール、 $120 \mu\text{l}$ のクロロホルム：イソアミルアルコール (24 : 1) を順次加え、各試薬の添加後に良く混和し、氷中に 5 分間放置した。マイクロチューブ用遠心機にて混合物を 4°C 、14,000 rpm で 20 分間遠心した後、上層を $300 \mu\text{l}$ ほど取って新しいチューブに移した。新しいチューブに同容量の 2-プロパノールを加えて上層液と混和した後、 -80°C に 30 ~ 60 分間放置した。チューブを取り出して氷中にてサンプルを解かした後、マイクロチューブ用遠心機にて 4°C 、14,000 rpm で 30 分間遠心した。上清を捨て、70 % エタノールで沈殿物を 3 回洗浄した後、沈殿物として得られた RNA のペレットを風乾した。10 ~ $20 \mu\text{l}$ の滅菌水を RNA のペレットに加え、 65°C の温浴槽で 1 ~ 2 分間加温して RNA を溶解した。得られた RNA 溶液を DNase I (Amplification Grade) (Cat. No. 18068-015) (米国、GIBCO BRL[®]) で処理してゲノム DNA を分解した。更に、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行って RNA を精製し、得られた RNA の沈殿物を滅菌水に溶解して RNA とした。

(3) RT-PCR法

上記のようにして調製したRNA 1 ~ 5 μ gを、SUPERSCRIPT™ II RNase H- Reverse Transcriptase (Cat. No. 18064-014) (米国、GIBCO BRL®) のプロトコルに従い、逆転写反応によってcDNAを合成した。mRNAの発現量はコントロールであるG3PDH遺伝子の発現量に対する発現率として求めたため、C5L2遺伝子とG3PDH遺伝子をそれぞれPCRで増幅した。

PCRはGeneAmp® PCR Core Reagents (米国、PERKIN ELMER社製) を用いて、添付のプロトコールに従って行った。RNA 15 ng分に相当するcDNA溶液21.3 μ lに10 \times PCR Bufferを3 μ l、25 mM MgCl₂を2.4 μ l、10 mMのdATP、dGTP、dCTP、dTTPをそれぞれ0.6 μ lずつ、20 μ Mの5'プライマーと3'プライマーをそれぞれ0.3 μ lずつ加え、更にTaqStart™ Antibody (米国、CLONTECH社製) を0.15 μ l、AmpliTaq® DNA Polymeraseを0.15 μ l加えて混合した。C5L2遺伝子の増幅には配列番号9と10に記載のプライマーを、G3PDH遺伝子の増幅には配列番号11と12のプライマーをそれぞれ使用した。TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用いて、94℃、2分の変性ステップの後、94℃、45秒、60℃、45秒、72℃、2分を1サイクルとして30サイクルの増幅反応を行った。最終サイクルのあ

とに 72℃、7 分の伸長反応を行い、その後 4℃まで冷却して反応を終了させた。反応液 10 μ l を、2% アガロースゲルを用いて電気泳動した後、Gel Print 2000i/VGA (米国、Bio Image 社製) を用いて電気泳動画像をコンピューターに取り込んだ。画像解析ソフト Basic Quantifier (日本国、日本バイオイメージリミテッド社) で各遺伝子の PCR 産物量を数値化し、同一サンプル中の G3PDH 遺伝子の PCR 産物量を 100% とした相対値で C5L2 遺伝子の PCR 産物量を表した。PCR は 2 回行い、その平均値を解析に用いた。

(4) 健常人の解析

上記の (1) ~ (3) の方法を用いて、健常人ボランティア 8 例から調製した PBM C 及び顆粒球における C5L2 遺伝子の発現率を調べた。フローサイトメーターによる細胞純度検定では、顆粒球画分の CD66b 陽性細胞の割合は、細胞画分中の全細胞数に対して $90.5 \pm 3.2\%$ (平均 \pm S.E.) であり、PBM C 画分における CD66b 陽性細胞の割合は、 $4.1 \pm 0.9\%$ であった。顆粒球における C5L2 遺伝子の発現率は $73.4 \pm 17.8\%$ 、PBM C における C5L2 遺伝子の発現率は $0.5 \pm 0.5\%$ であった。この結果から、C5L2 遺伝子が主に顆粒球で発現していることが判明した ($p \leq 0.01$)。結果を表 1 に示した。

表 1

健常人末梢血由来単核球（P B M C）画分及び顆粒球画分
における C 5 L 2 遺伝子の発現率

	P B M C 画分	顆粒球画分
C 5 L 2 遺伝子発現率 ^{a)}	0.5 ± 0.5	73.4 ± 17.8
C D 6 6 b 陽性率 ^{b)}	4.1 ± 0.9	90.5 ± 3.2

平均値 ± S.E. ^{a)} % G 3 P D H ^{b)} F A C S 解析 (%)

（５）採血後の C 5 L 2 遺伝子発現率の経時変化

次に、採血後の C 5 L 2 遺伝子発現率の経時変化を調べた。健常人ボランティア 8 例で、採血直後の血液（以下、屢々、単に“新鮮血”と称す）から調製した顆粒球と、採血後 1 晩放置した血液（以下、屢々、単に“保存血”と称す）から調製した顆粒球における、C 5 L 2 遺伝子の発現率を比較した。新鮮血から調製した顆粒球の C 5 L 2 遺伝子の発現率は、G 3 P D H 遺伝子の発現率を 100% とした相対値で表して 73.4 ± 17.8%、保存血から調製した顆粒球での C 5 L 2 遺伝子の発現率は 10.8 ± 3.1% であり、C 5 L 2 遺

伝子の発現率は経時的に減少することが明らかとなった ($p \leq 0.01$)。結果を表3に示した。

さらに、健常人ボランティア3例について採血直後、6時間後及び24時間後に末梢血から調製した顆粒球について、同様にC5L2遺伝子の発現率を測定した。その結果、C5L2遺伝子の発現率の平均値は、採血直後で71.7%、6時間後で31.1%、24時間後で10.6%であった。このことから採血後6時間でC5L2遺伝子の発現率は急激に減少すること、その後24時間後まで減少を続けるがその変化ははじめの6時間と比較すると緩やかなことがわかった。結果を図2に示した。

(6) RA患者の解析

次に、RA患者8例の新鮮血からPBMC画分および顆粒球画分を調製し、C5L2遺伝子の発現率を比較した。その結果、PBMC画分ではほとんど発現しておらず ($0.0 \pm 0.0\%$)、顆粒球画分でのみ発現 ($44.7 \pm 4.7\%$) が認められた。RA患者においても、健常人同様にC5L2遺伝子が顆粒球画分で多く発現していることが明らかになった ($p \leq 0.01$)。このときのCD66b陽性細胞の割合は、PBMC画分では $3.3 \pm 2.2\%$ 、顆粒球画分では $80.9 \pm 5.8\%$ であった。結果を表2に示した。

次いで、RA患者8例の新鮮血および12例の保存血から

85

それぞれ調製した顆粒球画分でのC5L2遺伝子の発現を解析し、健常人ボランティア8例の新鮮血および保存血での解析結果と比較した。その結果、RA患者の新鮮血から調製した顆粒球画分におけるC5L2遺伝子発現率は、G3PDH遺伝子の発現率を100%とした相対値で表して $44.7 \pm 4.7\%$ 、RA患者保存血から調製した顆粒球画分でのC5L2遺伝子発現率は $42.8 \pm 6.9\%$ であった。RA患者由来の顆粒球画分におけるC5L2遺伝子の発現率は、健常人とは異なり、経時的には減少せずに発現率が維持されることが明らかとなった。保存血から調製した顆粒球画分におけるC5L2遺伝子の発現率は健常人で $10.8 \pm 3.1\%$ であったのに対し、RA患者では $42.8 \pm 6.9\%$ であり、RA患者由来の保存血におけるC5L2遺伝子の発現率は健常人よりも有意に高いことが認められた ($p \leq 0.001$)。結果を表3に示した。

表 2

RA患者末梢血由来単核球（P B M C）画分及び顆粒球画分
におけるC 5 L 2 遺伝子の発現率

	P B M C 画分	顆粒球画分
C 5 L 2 遺伝子発現率 ^{a)}	0 . 0 ± 0 . 0	4 4 . 7 ± 4 . 7
C D 6 6 b 陽性率 ^{b)}	3 . 3 ± 2 . 2	8 0 . 9 ± 5 . 8

平均値 ± S . E . ^{a)} % G 3 P D H ^{b)} F A C S 解析 (%)

表 3

健常人およびRA患者における末梢血由来顆粒球画分中での
C 5 L 2 遺伝子発現率の保存による変化

	新鮮血	保存血
健常人顆粒球画分	7 3 . 4 ± 1 7 . 8	1 0 . 8 ± 3 . 1
RA患者顆粒球画分	4 4 . 7 ± 4 . 7	4 2 . 8 ± 6 . 9

% G 3 P D H 平均値 ± S . E .

更に、RA患者の新鮮血におけるC 5 L 2 遺伝子の発現率とリウマトイド因子の発現率との間には、有意な正の相関関係が認められ（相関係数 $R = 0 . 8 4 6$ 、 $p \leq 0 . 0 1$ ）、C 5 L 2 遺伝子の発現率がリウマチの診断に有用であることが示された。結果を図 3 に示した。

産業上の利用可能性

本発明のヒト由来の新規な7回膜貫通型受容体蛋白質及びそれをコードするDNAを用いると、樹状細胞の機能が関与する疾患の治療又は予防に有用な物質のスクリーニングや、そのような疾患の診断方法や診断薬を作成することができる。更に、本発明の、ヒト白血球に発現している7回膜貫通型受容体蛋白質の発現量を測定することを包含する炎症性疾患の診断方法を用いると、速やかに炎症性疾患を診断することができ、且つ、従来、疾患の初期段階での診断が困難であったリウマチ等の早期診断が可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする実質的に純粋なヒト由来の7回膜貫通型受容体蛋白質。
2. 配列番号2に記載のアミノ酸配列の連続した少なくとも5個のアミノ酸からなる部分配列であることを特徴とする実質的に純粋なペプチド。
3. 請求項1に記載の7回膜貫通型受容体蛋白質をコードする単離されたDNA。
4. 配列番号1に記載の塩基配列を有することを特徴とする請求項3に記載の単離されたDNA。
5. 配列番号3に記載のDNAの中の連続した少なくとも12個の塩基からなるDNA断片あるいはその誘導体。
6. 配列番号4に記載のDNAの中の連続した少なくとも12個の塩基からなるDNA断片あるいはその誘導体。
7. 配列番号3に記載のDNAに相補的なRNAの中の連続した少なくとも12個の塩基からなるRNA断片あるいはそ

の誘導体。

8. 請求項3～6のいずれかに記載のDNAを複製可能な発現ベクターに組込んでなる複製可能な組換え体DNA。

9. 請求項8に記載の複製可能な組換え体DNAで形質転換された微生物又は培養細胞。

10. (a) 請求項3または4に記載のDNAを複製可能な発現ベクターに結合して、該DNAと複製可能な発現ベクターとを組込んでなる複製可能な組換え体DNAを得、

(b) 該複製可能な組換え体DNAで微生物又は培養細胞を形質転換させて形質転換体を形成せしめ、

(c) 該形質転換体を該微生物又は培養細胞の親細胞から選別し、

(d) 該形質転換体を培養して、該形質転換体に該DNAを発現させる、

ことを包含する方法によって該形質転換体の細胞表面に製造された7回膜貫通型受容体蛋白質。

11. 7回膜貫通型受容体蛋白質と結合しうるリガンドをスクリーニングする方法にして、請求項1又は10に記載の蛋白質、あるいは請求項2に記載のペプチドを、サンプル材料

と接触せしめ、該蛋白質又は該ペプチドとリガンドとの結合に対応して起きる変化を指標として、7回膜貫通型受容体蛋白質と結合しうるリガンドを検出することを包含する方法。

12. 7回膜貫通型受容体蛋白質と該蛋白質に対するリガンドとの結合を阻害する物質をスクリーニングする方法にして、請求項1又は10に記載の蛋白質、あるいは請求項2に記載のペプチドと該リガンドをサンプル材料と接触せしめ、そして該蛋白質又は該ペプチドと該リガンドとの結合に対応して起きる変化を指標として、7回膜貫通型受容体蛋白質とリガンドとの結合を阻害しうる物質を検出することを包含する方法。

13. 請求項1に記載の7回膜貫通型受容体蛋白質と特異的に結合しうる抗体。

14. 炎症性疾患の診断方法にして、ヒト白血球に発現されている7回膜貫通型受容体蛋白質の発現量を測定することを包含し、該7回膜貫通型受容体蛋白質が配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質であることを特徴とする炎症性疾患の診断方法。

15. 該炎症性疾患が慢性関節リウマチであることを特徴と

する請求項 1 4 に記載の診断方法。

1 6 . 該ヒト白血球がヒト顆粒球であることを特徴とする請求項 1 4 又は 1 5 に記載の診断方法。

1 7 . 該ヒト顆粒球がヒト組織から採取した顆粒球であることを特徴とする請求項 1 6 に記載の診断方法。

1 8 . 該ヒト顆粒球が診断を行う少なくとも 6 時間前に採取した顆粒球であることを特徴とする請求項 1 7 に記載の診断方法。

1 9 . 該発現量の測定を、該蛋白質をコードする m R N A の定量により行うことを特徴とする請求項 1 4 に記載の診断方法。

2 0 . 該 m R N A の定量を、R T - P C R 法で行うことを特徴とする請求項 1 9 に記載の診断方法。

2 1 . 該発現量の測定を、該白血球の細胞表面に存在する該蛋白質の定量により行うことを特徴とする請求項 1 4 に記載の診断方法。

9 2

2 2 . 該蛋白質の定量を、該蛋白質と特異的に反応する抗体を用いて行うことを特徴とする、請求項 2 1 に記載の診断方法。

1 / 3

Fig. 1(a)

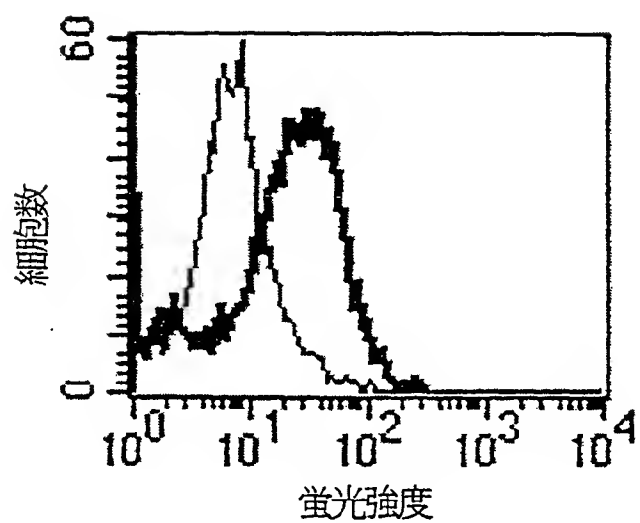
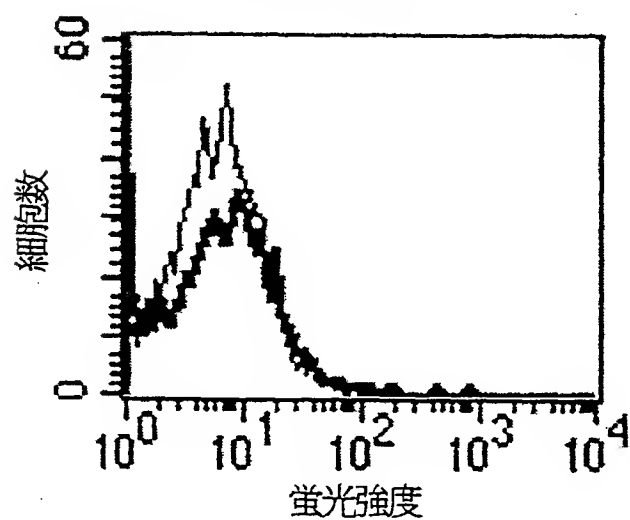
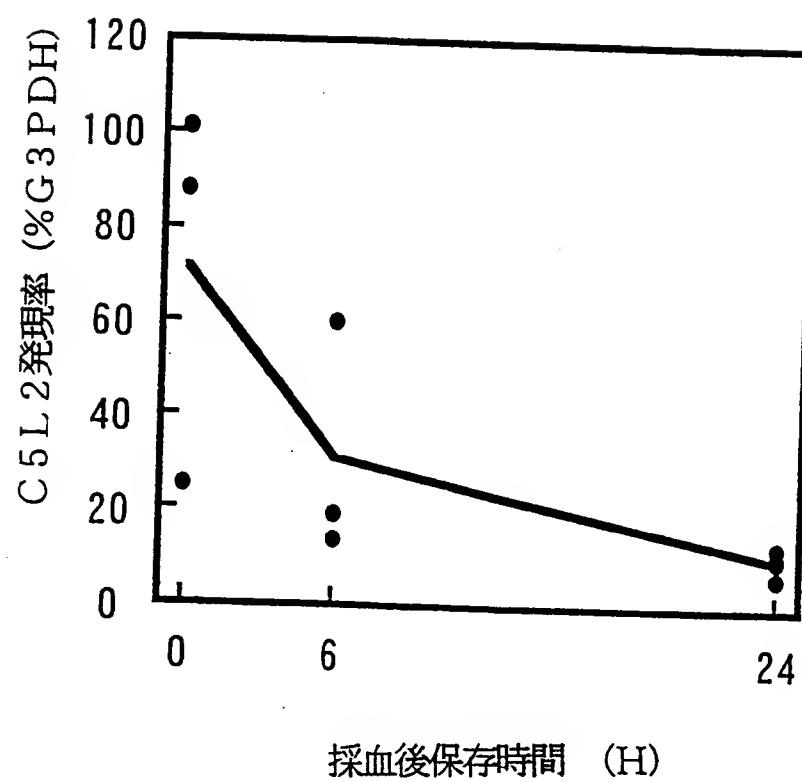


Fig. 1(b)



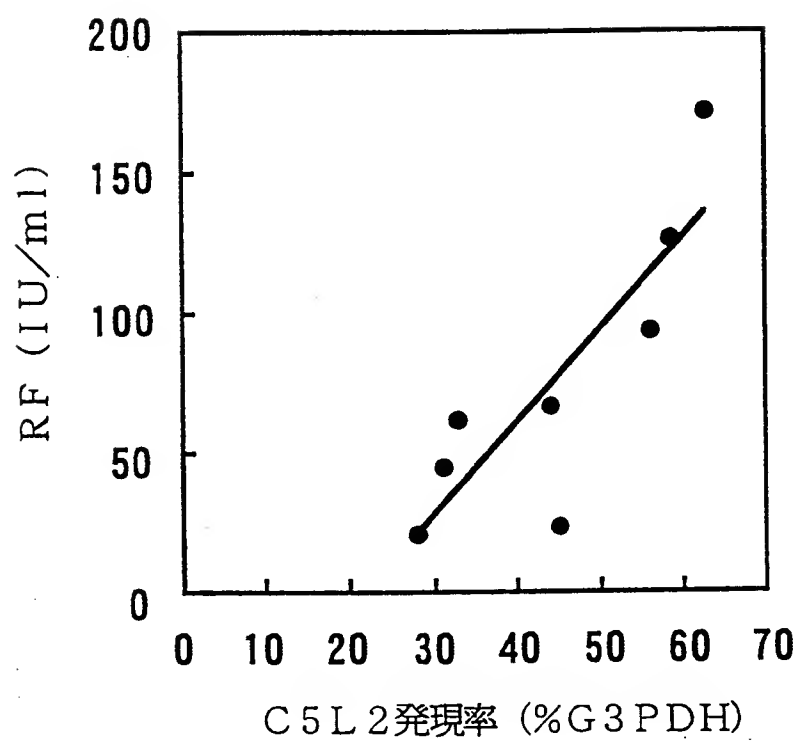
2 / 3

Fig. 2



3 / 3

Fig. 3



1/11

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> 旭化成工業株式会社

<120> 新規な受容体蛋白質及びそれを用いた炎症性疾患の診断方法

<130> 99-1043

<150> JP 10-249752

<151> 1998-09-03

<150> JP 11-070800

<151> 1999-03-16

<160> 12

<210> 1

<211> 1014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (1011)

<400> 1

atg ggg aac gat tct gtc agc tac gag tat ggg gat tac agc gac ctc 48
Met Gly Asn Asp Ser Val Ser Tyr Glu Tyr Gly Asp Tyr Ser Asp Leu

2/11

1	5	10	15	
tcg gac cgc cct gtc gac tgc ctg gat ggc gcc tgc ctg gcc atc gac	96			
Ser Asp Arg Pro Val Asp Cys Leu Asp Gly Ala Cys Leu Ala Ile Asp				
20	25	30		
ccg ctg cgc gtc gcc ccg ctc cca ctg tat gcc gcc atc ttc ctg gtc	144			
Pro Leu Arg Val Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val				
35	40	45		
ggg gtc ccg ggc aat gcc atg gtc gcc tgg gtc gct ggg aag gtc gcc	192			
Gly Val Pro Gly Asn Ala Met Val Ala Trp Val Ala Gly Lys Val Ala				
50	55	60		
cgc cgg agg gtc ggt gcc acc tgg ttg ctc cac ctg gcc gtc gcg gat	240			
Arg Arg Arg Val Gly Ala Thr Trp Leu Leu His Leu Ala Val Ala Asp				
65	70	75	80	
ttg ctg tgc tgt ttg tct ctg ccc atc ctg gca gtc ccc att gcc cgt	288			
Leu Leu Cys Cys Leu Ser Leu Pro Ile Leu Ala Val Pro Ile Ala Arg				
85	90	95		
gga ggc cac tgg ccg tat ggt gca gtc ggc tgt cgg gcg ctg ccc tcc	336			
Gly Gly His Trp Pro Tyr Gly Ala Val Gly Cys Arg Ala Leu Pro Ser				
100	105	110		
atc atc ctg ctg acc atg tat gcc agc gtc ctg ctc ctg gca gct ctc	384			
Ile Ile Leu Leu Thr Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Leu Ala Ala Leu				
115	120	125		
agt gcc gac ctc tgc ttc ctg gct ctc ggg cct gcc tgg tgg tct acg	432			
Ser Ala Asp Leu Cys Phe Leu Ala Leu Gly Pro Ala Trp Trp Ser Thr				
130	135	140		
gtt cag cgg gcg tgc ggg gtc cag gtc gcc tgt ggg gca gcc tgg aca	480			
Val Gln Arg Ala Cys Gly Val Gln Val Ala Cys Gly Ala Ala Trp Thr				
145	150	155	160	
ctg gcc ttg ctg ctc acc gtc ccc tcc gcc atc tac cgc cgg ctg cac	528			

3/11

Leu Ala Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Ala Ile Tyr Arg Arg Leu His
 165 170 175
 cag gag cac ttc cca gcc cgg ctg cag tgt gtg gtg gac tac ggc ggc 576
 Gln Glu His Phe Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val Asp Tyr Gly Gly
 180 185 190
 tcc tcc agc acc gag aat gcg gtg act gcc atc cgg ttt ctt ttt ggc 624
 Ser Ser Ser Thr Glu Asn Ala Val Thr Ala Ile Arg Phe Leu Phe Gly
 195 200 205
 ttc ctg ggg ccc ctg gtg gcc glg gcc agc tgc cac agt gcc ctc ctg 672
 Phe Leu Gly Pro Leu Val Ala Val Ala Ser Cys His Ser Ala Leu Leu
 210 215 220
 tgc tgg gca gcc cga cgc tgc cgg ccg ctg ggc aca gcc att gtg gtg 720
 Cys Trp Ala Ala Arg Arg Cys Arg Pro Leu Gly Thr Ala Ile Val Val
 225 230 235 240
 ggg ttt ttt gtc tgc tgg gca ccc tac cac ctg ctg ggg ctg gtg ctc 768
 Gly Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr His Leu Leu Gly Leu Val Leu
 245 250 255
 act gtg gcg gcc ccg aac tcc gca ctc ctg gcc agg gcc ctg cgg gct 816
 Thr Val Ala Ala Pro Asn Ser Ala Leu Leu Ala Arg Ala Leu Arg Ala
 260 265 270
 gaa ccc ctc atc gtg ggc ctt gcc ctc gct cac agc tgc ctc aat ccc 864
 Glu Pro Leu Ile Val Gly Leu Ala Leu Ala His Ser Cys Leu Asn Pro
 275 280 285
 atg ctc ttc ctg tat ttt ggg agg gct caa ctc cgc cgg tca ctg cca 912
 Met Leu Phe Leu Tyr Phe Gly Arg Ala Gln Leu Arg Arg Ser Leu Pro
 290 295 300
 gct gcc tgt cac tgg gcc ctg agg gag tcc cag ggc cag gac gaa agt 960
 Ala Ala Cys His Trp Ala Leu Arg Glu Ser Gln Gly Gln Asp Glu Ser
 305 310 315 320

4/11

gig gac agc aag aaa tcc acc agc cat gac ctg gtc tgc gag atg gag 1008

Val Asp Ser Lys Lys Ser Thr Ser His Asp Leu Val Ser Glu Met Glu

325

330

335

gig tag

1014

Val

<210> 2

<211> 337

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Asn Asp Ser Val Ser Tyr Glu Tyr Gly Asp Tyr Ser Asp Leu

1

5

10

15

Ser Asp Arg Pro Val Asp Cys Leu Asp Gly Ala Cys Leu Ala Ile Asp

20

25

30

Pro Leu Arg Val Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val

35

40

45

Gly Val Pro Gly Asn Ala Met Val Ala Trp Val Ala Gly Lys Val Ala

50

55

60

Arg Arg Arg Val Gly Ala Thr Trp Leu Leu His Leu Ala Val Ala Asp

65

70

75

80

Leu Leu Cys Cys Leu Ser Leu Pro Ile Leu Ala Val Pro Ile Ala Arg

85

90

95

Gly Gly His Trp Pro Tyr Gly Ala Val Gly Cys Arg Ala Leu Pro Ser

100

105

110

Ile Ile Leu Leu Thr Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Leu Ala Ala Leu

115

120

125

Ser Ala Asp Leu Cys Phe Leu Ala Leu Gly Pro Ala Trp Trp Ser Thr

5/11

130	135	140	
Val Gln Arg Ala Cys Gly	Val Gln Val Ala Cys Gly	Ala Ala Trp Thr	
145	150	155	160
Leu Ala Leu Leu Leu Thr	Val Pro Ser Ala Ile Tyr Arg Arg	Leu His	
165	170	175	
Gln Glu His Phe Pro Ala Arg	Leu Gln Cys Val Val Asp Tyr Gly Gly		
180	185	190	
Ser Ser Ser Thr Glu Asn Ala	Val Thr Ala Ile Arg Phe Leu Phe Gly		
195	200	205	
Phe Leu Gly Pro Leu Val Ala	Val Ala Ser Cys His Ser Ala Leu Leu		
210	215	220	
Cys Trp Ala Ala Arg Arg Cys	Arg Pro Leu Gly Thr Ala Ile Val Val		
225	230	235	240
Gly Phe Phe Val Cys Trp Ala	Pro Tyr His Leu Leu Gly Leu Val Leu		
245	250	255	
Thr Val Ala Ala Pro Asn Ser	Ala Leu Leu Ala Arg Ala Leu Arg Ala		
260	265	270	
Glu Pro Leu Ile Val Gly Leu	Ala Leu Ala His Ser Cys Leu Asn Pro		
275	280	285	
Met Leu Phe Leu Tyr Phe Gly	Arg Ala Gln Leu Arg Arg Ser Leu Pro		
290	295	300	
Ala Ala Cys His Trp Ala Leu	Arg Glu Ser Gln Gly Gln Asp Glu Ser		
305	310	315	320
Val Asp Ser Lys Lys Ser Thr	Ser His Asp Leu Val Ser Glu Met Glu		
325	330	335	
Val			

<210> 3

<211> 1287

6/11

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

cctgtgtgcc acgtgtgga caaatcttaa ctcccaagg acicccaaaa ccagagacac   60
caggagccctg aatggggaac gattctgtca gctacgagta tggggattac agcgacctct 120
cggaccgccc tgtggactgc ctggaaggcg cctgccctggc caicgacccg ctgcgcgtgg 180
ccccgtcccc actgtatgcc gccatcttcc tggtaggggt gccgggcaat gccatgggtg 240
cctgggtggc tgggaaggct gcccgccgga gggtaggtgc cactgggttg ctccacctgg 300
ccatggcgga ttgtgtgtc tgtttgtctc tgcctatctt ggcagtggcc attgcccggt 360
gaggtccactg gccgtatgtt gcagtgggtc gtccggcgct gccctccatc atctgtctga 420
ccatgtatgc cagcgtccctg ctccctggcag ctctcagctc cgacctctgc ttcttggtct 480
tcgggccctgc ctggtaggtc acggttcagc gggcgctcgg ggtgcaggct gccctgtggg 540
cagccctggac actggccctg ctgtcaccg tgcctccgc catctaccgc cggctgcacc 600
aggagcactt ccagcccgg ctgcagtgtg tggtaggacta cggcggtctc tccagcaccg 660
agaatgcggt gactgccatc cggtttcttt ttggcttctt ggggccccctg gtggccgtgg 720
ccagctgcca cagtgcctc ctgtgtctgg cagcccagc ctgccggccg ctgggcacag 780
ccattgtggt ggggtttttt gctgtctggg caccctacca cctgtctggg ctgtgtctca 840
ctgtggcggc ccgaactcc gcactcttg ccaggggcct gcgggtgaa cccctatcg 900
tgggcttgc cctcgtcac agctgccca atcccatgt ctctctgtat ttgggaggg 960
ctcaactccg ccgttcactg ccagctgctt gtcactgggc cctgaggag tcccagggcc 1020
aggacgaaag tgtggacagc aagaaatcca ccagccaatg cctggctctg gagatggagg 1080
tgtaggcttg agagacattg tgggtgtgta tctcttctc tcatctcaca agactggctt 1140
caggcatagc tggatccagg agctcaatga tgccttctt ttattcttct ctcatctca 1200
cagatatcca tcatgcactt gctatgtgca aggccttttt aggcactaga gatatagcag 1260
tgacaaaaac agacacaaat cctgccc                                     1287

```

<210> 4

<211> 1287

7/11

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

gggcaggatt tggctctgtt ttggctcact ctatctctct agtgcctaaa aaggccttgc 60
acatagcaag tgcatgatgg ataictgttg aatgaaggaa ggaalaaaat gaagacaica 120
ttgagctcct ggalccagct atgcttgaag ccagctctgt gaaatgagat aagaagatac 180
acaccacaaa tgtctctcca gccacacct ccactctcca gaccaggica tggctgggtg 240
attcttggct gtccacactt tcttctggc cctgggactt cctcagggcc cagtgacagg 300
cagctggcag tgaccggcgg agttagagccc tcccaaaaata caggaagagc atgggattga 360
ggcagctgtg agcagaggga agggccacga taggggttgc agcccgagg gccctggcca 420
ggagtgccga gtctggggcc gccacagtga gcaccagccc cagcaggttg tagggcgccc 480
agcagacaaa aaacccacc acaatggctg tggccagcgg ccggcagcgt cgggctgccc 540
agcacaggag ggcactgttg cagctggcca cggccaccag gggccccagg aagccaaaaa 600
gaaaccggat ggcagtcacc gcatctctgg tctggagga gccgccgtag tccaccacac 660
actgcagccg ggttgggaag tcttctgtt gcagccggcg gtagatggcg gagggcacgg 720
tgagcagcaa ggccagtgtc caggctgccc cacaggccac ctgcacccc cagccccgt 780
gaaccgtaga ccaccaggca gggccgagag ccaggaagca gaggctggca ctgagagctg 840
ccaggagcag gacgctggca tacaatggca gcaggaatgat ggagggcagc gcccgacagc 900
ccactgcacc atacggccag tggcctccac gggcaatggg cactgccagg atgggcagag 960
acaaacagca cagcaaatcc gccacggcca ggtggagcaa ccaggctggca cccacccctc 1020
ggcggggccac ctctccagcc acccaggcca ccattggcatt gcccggcacc cccaccagga 1080
agatggcggc atacagtggg agcggggcca cgcgcagcgg gtctgatggc aggcaggcgc 1140
catccaggca gtccacaggg cggctcgaga ggctcgtgta atccccatac tcttagctga 1200
cagaatcgtt cccattcag gctccgggtg tctctgggtt tgggagtcct tgaggagtta 1260
agatttgicc agcacgtggc acacagg                                     1287

```

<210> 5

<211> 30

8/11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 18、22、24残基めのnはイノシン/iを示す。メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の7回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインした degenerative PCR法のためのプライマー。

<400> 5

atcttaagct tgaacccingc cningcdgac 30

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 22、28残基めのnはイノシン/iを示し、21残基めのnはaまたはgまたはcまたはtを示す。メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の7回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインした degenerative PCR法のためのプライマー。

<400> 6

cccaacgaat lcrtagatsa nnggrtinav rca 33

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

9/11

<220>

<223> 配列番号 1 の塩基配列の 1 番目の a から 22 番目の t に相当する 22 塩基の配列の 5' 末端にスパーサー配列 g g g g および制限酵素 H i n d Ⅲ の認識配列 a a g c t t を加えた配列であり、C 5 L 2 の発現ベクターの構築に用いた化学合成プライマー。

<400> 7

ggggaagctt atggggaacg attctgtcag ct 32

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 配列番号 4 の塩基配列の 206 番目の c から 225 番目の a に相当する 20 塩基の配列の 5' 末端にスパーサー配列 g g g a と制限酵素 S a c Ⅱ の認識配列 c c g c g g を加えた配列であり、C 5 L 2 の発現ベクターの構築に用いた化学合成プライマー。

<400> 8

gggaccgcgg caccaccaic tccgagacca 30

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10/11

<220>

<223> C 5 L 2 の R T - P C R で用いられた化学合成プライマー。

<400> 9

atcatcctgc tgacatgta tgccag 26

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C 5 L 2 の R T - P C R で用いられた化学合成プライマー。

<400> 10

aacggatgg cagtcaccgc attct 25

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G 3 P D H (グリセルアルデヒド 3 - リン酸脱水素酵素) の R T - P C R
で用いられた化学合成プライマー。

<400> 11

tgaaggtcgg agtcaacgga ttltgt 26

11/11

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G 3 P D H の R T - P C R で用いられた化学合成プライマー。

<400> 12

catgigggcc atgaggicca ccac

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04801

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, 5/00, 1/21, 1/19, 1/15, C07K14/705, 16/28, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, 5/00, 1/21, 1/19, 1/15, C07K14/705, 16/28, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/DBJ/EMBL/GENESEQ

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US, 5508384, A (UNIV NEW YORK STATE), 16 April, 1996 (16. 04. 96), columns 99-100 Full text ; Figs. 1 to 8 (Family: none)	2 1, 3-13
X A	Immunogenetics, 44, p446-452, 1996 Alvarez V. et al., "Molecular evolution of the N-formyl peptide and C5a receptors in non-human primates"	2 1, 3-13
X A	Biochemistry, 30(12), p.2993-2999, 26 Mar. 1991 Boulay F., "Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells"	5 1-4, 6-13
X A	Biochem. J., 288, p.911-917, 15 Dec. 1992 Jason J. Perret, "Cloning and functional expression of the canine anaphylatoxin C5a receptor. Evidence for high interspecies variability"	2, 5 1, 3, 4, 6-13
X A	Nature, 349, p.614-617, 14 Feb. 1991 Norma P. Gerard et al., "The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin"	5 1-4, 6-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 October, 1999 (14. 10. 99)Date of mailing of the international search report
2 November, 1999 (02. 11. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04801

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14 to 22

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 14 to 22 pertain to diagnostic methods practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/12, 5/00, 1/21, 1/19, 1/15,
C07K14/705, 16/28, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/12, 5/00, 1/21, 1/19, 1/15,
C07K14/705, 16/28, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/DDBJ/EMBL/GENESEQ
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	US, 5508384, A (UNIV NEW YORK STATE) 16. 4月. 1996 (16. 04. 96) columns 99-100 全文, 第1-8図 (ファミリーなし)	2 1、3-13
X A	Immunogenetics, 44, p. 446-452, 1996 Alvarez V. et al., "Molecular evolution of the N-formyl peptide and C5a receptors in non-human primates"	2 1、3-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 10. 99

国際調査報告の発送日

02.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4 B 9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Biochemistry, 30(12), p. 2993-2999, 26 Mar. 1991 Boulay F., "Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells"	5 1-4, 6-13
X A	Biochem. J., 288, p. 911-917, 15 Dec. 1992 Jason J. Perret, "Cloning and functional expression of the canine anaphylatoxin C5a receptor. Evidence for high interspecies variability"	2, 5 1, 3, 4, 6-13
X A	Nature, 349, p. 614-617, 14 Feb. 1991 Norma P. Gerard et al., "The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin"	5 1-4, 6-13

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 請求の範囲 14-22 は、人の診断方法であるから、PCT 17 条 (2) (a) (I) 及び PCT 規則 39.1 (IV) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとその国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

